

Università degli Studi di Napoli

“Federico II”

FACOLTÀ DI FARMACIA



DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZA DEL FARMACO

XX CICLO

TESI SPERIMENTALE IN  
MODELLISTICA MOLECOLARE

STUDI DI MODELLISTICA MOLECOLARE SUI SISTEMI COINVOLTI NEI  
DISORDI CONFORMAZIONALI PROTEICI :  
*PROGETTAZIONE DI NUOVI POTENZIALI STRUMENTI TERAPEUTICI  
E/O DIAGNOSTICI.*

COORDINATORE

CH. MO PROF. MARIA VALERIA D'AURIA

CANDIDATO

DOTT. MARIANNA BORRIELLO

TUTOR

CH. MO PROF. CATERINA FATTORUSSO

# INDICE

<b>1. INTRODUZIONE.....</b>	<b>3</b>
1.1a <i>I disordini conformazionali proteici (PCD).....</i>	4
1.1b <i>Meccanismo di Formazione delle Fibrille Amiloidee. ....</i>	7
1.1c <i>Il Morbo di Alzheimer. ....</i>	12
<b>2. PROGETTAZIONE DI NUOVI AGENTI DIAGNOSTICI E TERAPEUTICI DELL'AD 18</b>	
2.1 INTRODUZIONE.....	19
2.1a <i>Metallobiologia del Morbo di Alzheimer.....</i>	19
2.1b <i>Modalità di legame di A<math>\beta</math> con i Metalli. ....</i>	26
2.2 SCOPO DEL LAVORO.....	30
2.2a <i>Diagnostici di Imaging per l'AD.....</i>	30
2.2b <i>Progettazione di Nuovi Agenti Diagnostici e Terapeutici. ....</i>	32
2.3 MATERIALI E METODI .....	37
2.3a <i>Determinazione delle proprietà chimico-fisiche dei composti sviluppati .....</i>	37
2.3b <i>Analisi bioinformatica .....</i>	40
2.4 RISULTATI E DISCUSSIONE.....	41
2.5 CONCLUSIONI.....	63
<b>3. PROGETTAZIONE DI NUOVI E POTENTI INIBITORI DELLE COLINESTERASI ... 65</b>	
3.1 INTRODUZIONE.....	66
3.1a <i>Il sistema colinergico e l'AD.....</i>	66
3.1b <i>Struttura e Funzione delle Colinesterasi .....</i>	67
3.1c <i>Ruolo delle Colinesterasi nell'AD .....</i>	70
3.2 SCOPO DEL LAVORO .....	75
3.3 MATERIALI E METODI .....	79
3.3a <i>Scelta dei Parametri di Docking. ....</i>	81
3.3b <i>Procedura di Docking.....</i>	83
3.3c <i>Analisi Bioinformatica .....</i>	88
3.4 RISULTATI E DISCUSSIONE.....	91
3.4a <i>Analisi delle Strutture X-ray delle ChE .....</i>	95
3.4b <i>Analisi Bioinformatica: Identificazione degli hot spots della proteina. ....</i>	137
3.4c <i>Relazione Struttura Attività dei composti 3a-m.....</i>	149
3.5 CONCLUSIONI.....	168
<b>4. PROSPETTIVE .....</b>	<b>170</b>
<b>5. RIFERIMENTI.....</b>	<b>175</b>

# **1. INTRODUZIONE**

### ***1.1a I disordini conformazionali proteici (PCD).***

Un vasto numero di disturbi degenerativi deriva dall'incapacità di un peptide o di una proteina ad adottare o a mantenere la sua conformazione nativa, responsabile del suo ruolo fisiologico. Questi disturbi prendono il nome di disordini conformazionali proteici o disordini del *misfolding* (Protein Conformational Disease, PCD) e includono sia gli stati patologici in cui si verifica un'alterazione del meccanismo biologico di strutturazione (*folding*) delle proteine che le *amiloidosi*. Al primo tipo di PCD appartengono patologie come la fibrosi cistica<sup>1</sup>, l'enfisema ereditario<sup>2</sup> ed alcuni tipi di cancro. In esse il mancato *folding* di una specifica proteina determina una drammatica diminuzione della sua funzionalità biologica. Questa alterazione può provenire da un errore genetico nella sintesi della proteina stessa o da modifiche post-traduzionali che ne hanno aumentato la degradazione da parte dei sistemi di controllo del reticolo endoplasmatico (RE), come avviene per esempio nella fibrosi cistica, oppure da un malfunzionamento del complesso sistema di trasporto delle proteine attraverso le membrane, come avviene nell'enfisema ereditario.

Nelle *amiloidosi*, invece, l'evento critico consiste nel *misfolding* di una proteina (o di un peptide) ovvero nel cambiamento conformazionale che ne determina la perdita della conformazione nativa funzionale e ne induce l'aggregazione in depositi fibrillari insolubili. Questi depositi, distinti in “fibrille/placche” se extracellulari o “inclusioni intracellulari” se all'interno della cellula<sup>3</sup>, danneggiano fisicamente i



tessuti in cui si accumulano e, in alcuni casi, determinano l'insorgere di un'attività tossica della proteina stessa oltre che la perdita della sua funzionalità biologica. Le *amiloidosi* vengono genericamente distinte in: i) neurodegenerative, se a carico del sistema nervoso centrale (SNC); ii) non neuropatiche localizzate, se l'aggregazione si verifica in un solo tipo di tessuto e iii) non neuropatiche sistemiche, se invece essa si verifica in più tessuti.

Alle PCD di tipo neurodegenerativo appartengono disordini come il Morbo di Alzheimer (AD), il Morbo di Parkinson (PD) e il morbo di Crautzfeldt-Jacob.

Una lista dettagliata dei disturbi degenerativi associati alla formazione di fibrille extracellulari o inclusioni intracellulari e delle proteine principali componenti di questi depositi è riportata in tabella 1.

**Tabella 1.** Elenco dei disordini associati a formazioni di depositi amiloidei extracellulari o ad inclusioni intracellulari con caratteristiche amiloidee.

Disease	Aggregating protein or peptide	Number of residues <sup>a</sup>	Native structure of protein or peptide <sup>b</sup>
Neurodegenerative diseases			
Alzheimer's disease <sup>c</sup>	Amyloid $\beta$ peptide	40 or 42 <sup>f</sup>	Natively unfolded
Spongiform encephalopathies <sup>c,e</sup>	Prion protein or fragments thereof	253	Natively unfolded (residues 1–120) and $\alpha$ -helical (residues 121–230)
Parkinson's disease <sup>c</sup>	$\alpha$ -Synuclein	140	Natively unfolded
Dementia with Lewy bodies <sup>c</sup>	$\alpha$ -Synuclein	140	Natively unfolded
Frontotemporal dementia with Parkinsonism <sup>c</sup>	Tau	352–441 <sup>f</sup>	Natively unfolded
Amyotrophic lateral sclerosis <sup>c</sup>	Superoxide dismutase 1	153	All- $\beta$ , Ig like
Huntington's disease <sup>d</sup>	Huntingtin with polyQ expansion	3144 <sup>g</sup>	Largely natively unfolded
Spinocerebellar ataxias <sup>d</sup>	Ataxins with polyQ expansion	816 <sup>g,h</sup>	All- $\beta$ , AXH domain (residues 562–694); the rest are unknown
Spinocerebellar ataxia 17 <sup>d</sup>	TATA box-binding protein with polyQ expansion	339 <sup>g</sup>	$\alpha$ + $\beta$ , TBP like (residues 159–339); unknown (residues 1–158)
Spinal and bulbar muscular atrophy <sup>d</sup>	Androgen receptor with polyQ expansion	919 <sup>g</sup>	All- $\alpha$ , nuclear receptor ligand-binding domain (residues 669–919); the rest are unknown
Hereditary dentatorubral-pallidoluysian atrophy <sup>d</sup>	Atrophin-1 with polyQ expansion	1185 <sup>g</sup>	Unknown
Familial British dementia <sup>d</sup>	ABri	23	Natively unfolded
Familial Danish dementia <sup>d</sup>	ADan	23	Natively unfolded

Nonneuropathic systemic amyloidoses			
AL amyloidosis <sup>c</sup>	Immunoglobulin light chains or fragments	~90 <sup>f</sup>	All-β, Ig like
AA amyloidosis <sup>c</sup>	Fragments of serum amyloid A protein	76–104 <sup>f</sup>	All-α, unknown fold
Familial Mediterranean fever <sup>c</sup>	Fragments of serum amyloid A protein	76–104 <sup>f</sup>	All-α, unknown fold
Senile systemic amyloidosis <sup>c</sup>	Wild-type transthyretin	127	All-β, prealbumin like
Familial amyloidotic polyneuropathy <sup>d</sup>	Mutants of transthyretin	127	All-β, prealbumin like
Hemodialysis-related amyloidosis <sup>c</sup>	β2-microglobulin	99	All-β, Ig like
ApoAI amyloidosis <sup>d</sup>	N-terminal fragments of apolipoprotein AI	80–93 <sup>f</sup>	Natively unfolded
ApoAII amyloidosis <sup>d</sup>	N-terminal fragment of apolipoprotein AII	98 <sup>i</sup>	Unknown
ApoAIV amyloidosis <sup>c</sup>	N-terminal fragment of apolipoprotein AIV	~70	Unknown
Finnish hereditary amyloidosis <sup>d</sup>	Fragments of gelsolin mutants	71	Natively unfolded
Lysozyme amyloidosis <sup>d</sup>	Mutants of lysozyme	130	α+β, lysozyme fold
Fibrinogen amyloidosis <sup>d</sup>	Variants of fibrinogen α-chain	27–81 <sup>f</sup>	Unknown
Icelandic hereditary cerebral amyloid angiopathy <sup>d</sup>	Mutant of cystatin C	120	α+β, cystatin like
Nonneuropathic localized diseases			
Type II diabetes <sup>c</sup>	Amylin, also called islet amyloid polypeptide (IAPP)	37	Natively unfolded
Medullary carcinoma of the thyroid <sup>c</sup>	Calcitonin	32	Natively unfolded
Atrial amyloidosis <sup>c</sup>	Atrial natriuretic factor	28	Natively unfolded
Hereditary cerebral haemorrhage with amyloidosis <sup>d</sup>	Mutants of amyloid β peptide	40 or 42 <sup>f</sup>	Natively unfolded
Pituitary prolactinoma	Prolactin	199	All-α, 4-helical cytokines
Injection-localized amyloidosis <sup>c</sup>	Insulin	21 + 30 <sup>j</sup>	All-α, insulin like
Aortic medial amyloidosis <sup>c</sup>	Medin	50 <sup>k</sup>	Unknown
Hereditary lattice corneal dystrophy <sup>d</sup>	Mainly C-terminal fragments of kerato-epithelin	50–200 <sup>f</sup>	Unknown
Corneal amyloidosis associated with trichiasis <sup>c</sup>	Lactoferrin	692	α+β, periplasmic-binding protein like II
Cataract <sup>c</sup>	γ-Crystallins	Variable	All-β, γ-crystallin like
Calcifying epithelial odontogenic tumors <sup>c</sup>	Unknown	~46	Unknown
Pulmonary alveolar proteinosis <sup>d</sup>	Lung surfactant protein C	35	Unknown
Inclusion-body myositis <sup>c</sup>	Amyloid β peptide	40 or 42 <sup>f</sup>	Natively unfolded
Cutaneous lichen amyloidosis <sup>c</sup>	Keratins	Variable	Unknown

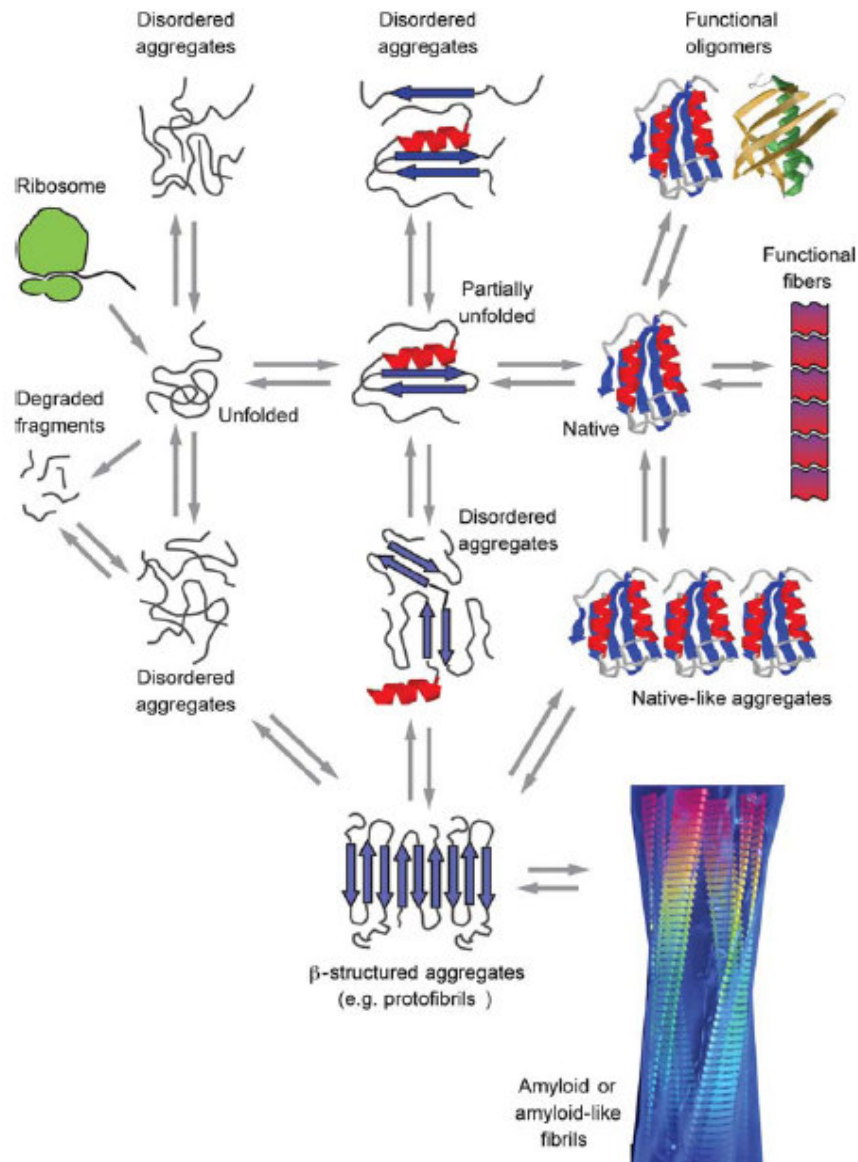
<sup>a</sup> I dati si riferiscono al numero di residui di catene polipeptidiche processate che si depositano in aggregati, non alle proteine precursori. <sup>b</sup> In accordo con la Classificazione Strutturale delle Proteine (SCOP), viene indicata la classe strutturale e la conformazione degli stati nativi dei peptidi processati o delle proteine che si depositano in aggregati prima dell'aggregazione. <sup>c</sup> Predominantemente sporadico, sebbene in alcuni casi siano documentati casi di forme ereditarie dovute a specifiche mutazioni. <sup>d</sup> Predominantemente ereditario, sebbene in alcuni casi siano documentati casi di forme sporadiche. <sup>e</sup> Nel 5% dei casi vengono trasmesse (per esempio iatrogene). <sup>f</sup> Vengono generati frammenti di varia lunghezza che sono stati riportati essere presenti nelle fibrille ex vivo. <sup>g</sup> Le lunghezze mostrate si riferiscono alla sequenza normale con tratti non patogenici del poliQ. <sup>h</sup> La lunghezza mostrata è per l'ataxina-1. <sup>i</sup> La mutazione patogenica converte il codone di stop in un codone di glicina, allungando la proteina di 77 residui di 21 residui addizionali. <sup>j</sup> L'insulina umana è costituita da due catene (A e B, con 21 e 30 residui, rispettivamente) covalentemente legate da ponti disolfuri. <sup>k</sup> Medin è il frammento 245–294 della lactaderina umana.

### ***1.1b Meccanismo di Formazione delle Fibrille Amiloidee.***

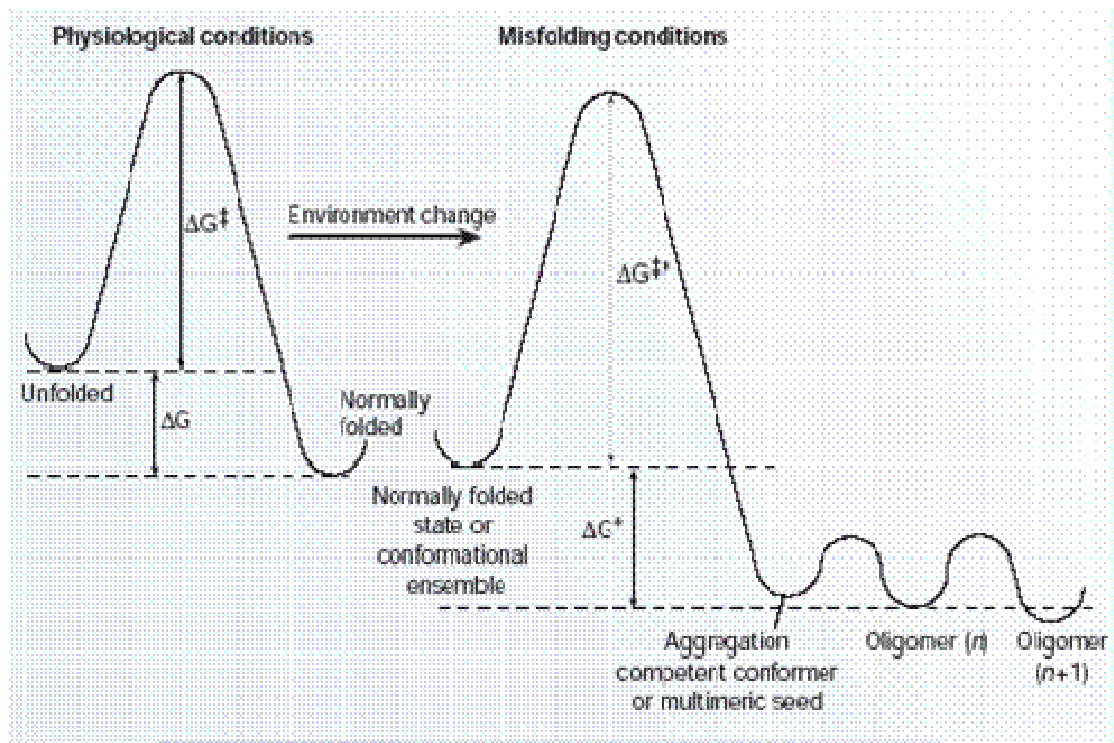
Per comprendere il meccanismo patologico attraverso cui una proteina (o un peptide) va incontro al fenomeno del *misfolding* ed alla sua successiva aggregazione in strutture aberranti, è necessario conoscere gli stati conformazionali e le strutture oligomeriche che una catena polipeptidica può assumere durante questo processo e determinare le componenti cinetiche e termodinamiche associate a questi stati. Questo implica, quindi, la caratterizzazione a livello molecolare dei cambiamenti conformazionali della proteina e l'identificazione dei residui amminoacidici e/o delle regioni (motivi o domini proteici) che possono promuovere e direzionare tali cambiamenti. E' importante sottolineare che la caratterizzazione degli stati oligomerici che precedono la formazione delle fibrille amiloidee risulta essere particolarmente importante alla luce del fatto che numerose evidenze sperimentali identificano un ruolo cruciale di queste specie nella patogenesi di diverse *amiloidosi*. Uno schema generale del network di equilibri che connettono alcuni tra i più importanti stati conformazionali che una proteina può assumere, sia all'interno che all'esterno delle cellule, è illustrato in **Figura 1**.

In seguito alla sua sintesi sul ribosoma, una catena polipeptidica si trova inizialmente in uno stato non assemblato. In questo stato essa può sia strutturarsi in più conformazioni, ognuna delle quali caratterizzate da piccole sub-strutture persistenti, che assumere un'unica conformazione compatta, seppur attraversando stati intermedi parzialmente strutturati.

Nella normale sintesi proteica, la maggior parte delle proteine trova velocemente la sua conformazione funzionale o stato nativo, poiché il processo che ne sottende la formazione possiede un'energia libera di attivazione sormontabile, e lo stato nativo stesso è a minore energia<sup>4</sup> (Figura 2).



**Figura 1.** Schema dei principali stati conformazionali che una proteina può adottare e degli equilibri di connessione tra loro.



**Figura 2.** Energia libera di attivazione associata ai processi di *folding* e *misfolding* delle proteine.

In alcuni casi, proteine strutturate in forma monomerica possono poi associarsi in oligomeri e strutture aggregate (ben lontane da quelle amiloidee) che ne costituiscono le forme fisiologicamente funzionali. Esempi di proteine che agiscono fisiologicamente in forma aggregata sono l'actina, la miosina e i microtubuli che agiscono sotto forma di polimeri.

Tutti gli stati conformazionali a cui una proteina può andare incontro e i possibili equilibri che li generano, sono finemente regolati nei sistemi biologici da chaperoni molecolari, sistemi di degradazione e dai processi generalmente chiamati di “controllo di qualità”. Talvolta però questo complesso sistema di controllo può fallire o si possono verificare variazioni dell'ambiente circostante tali da alterare significativamente gli equilibri tra gli stati conformazionali illustrati, quali ad

esempio lo stesso aumento delle concentrazioni della proteina. In tali condizioni, proteine già strutturate ma anche catene peptidiche non ancora o parzialmente strutturate, peptidi o frammenti di proteine originatisi da proteolisi anomale, possono risultare particolarmente sensibili all'aggregazione e dar luogo a strutture polimeriche amorfe, che possono sia dissociarsi sia evolvere in oligomeri se le condizioni che ne hanno indotto la formazione persistono. Gli aggregati formati possono successivamente accrescersi in fibrille mature attraverso un ulteriore auto-aggregazione o la repentina aggiunta di altri monomeri.

E' chiaro che affinché si possano verificare le condizioni necessarie alla formazione di strutture multimeriche fibrillari altamente ordinate, è necessaria la presenza di un numero critico ed elevato di molecole non strutturate, così che il contributo entalpico apportato dal loro assemblaggio risulti essere tale da superare la perdita di entropia configurazionale associata.

Come precedentemente accennato, anche proteine già strutturate possono andare incontro ad aggregazione, ma ciò deve prevedere un cambiamento conformazionale della proteina tale da determinare la perdita della sua struttura nativa (*misfolding*) e indurne la polimerizzazione anomala. Sempre maggiori evidenze sperimentali evidenziano che il fenomeno del *misfolding* di una proteina è strettamente correlato alle variazioni dell'ambiente ad essa circostante, quali ad esempio stress ossidativo, variazioni del pH o dell'omeostasi di alcuni ioni. E' solo in queste condizioni, infatti, che gli stati oligomerici e/o multimerici della proteina possono risultare più stabili dal punto di vista termodinamico (Figura 2). E' importante sottolineare che il

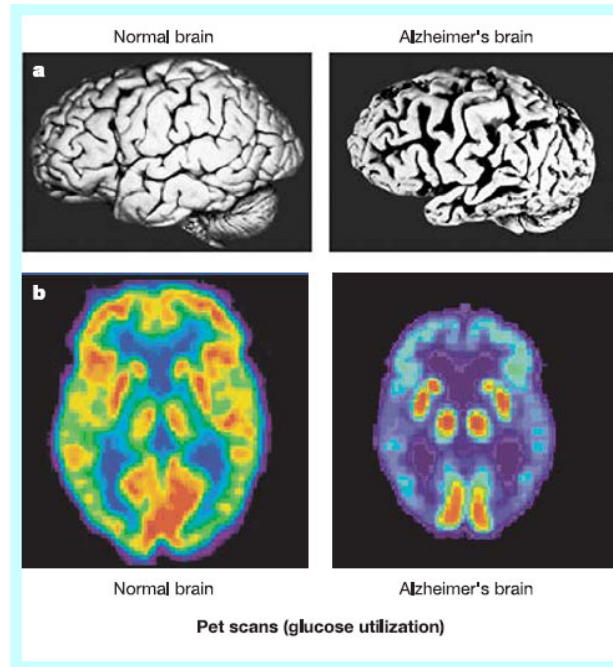
*misfolding* della proteina può essere totale ma anche parziale e che l'aggregazione può essa stessa essere la causa di questo fenomeno. Sebbene infatti durante i primi stadi del processo di aggregazione sia necessario un primo riarrangiamento conformazionale della proteina coinvolta, l'interazione che successivamente si instaura all'interfaccia tra gli oligomeri è certamente responsabile del definitivo e, sostanziale, cambiamento conformazionale che determina poi l'irreversibilità del processo.

In condizioni fisiologiche, tuttavia, i processi di *misfolding* e aggregazione sono solitamente “effetti collaterali intrinseci” delle transizioni conformazionali necessarie al corretto funzionamento dei sistemi biologici di un organismo. La formazione degli aggregati, infatti, è normalmente inibita da chaperoni e processi di degradazione, nonché dalla natura della stessa sequenza peptidica che viene accuratamente selezionata dal processo evolutivo al fine di impedire che essa risulti prona all'aggregazione.

Quando, tuttavia, i processi di aggregazione sfuggono ai normali sistemi di difesa si originano i *disordini conformazionali proteici*.

### ***1.1c Il Morbo di Alzheimer.***

Il morbo di Alzheimer (AD) è un disordine conformazionale proteico di tipo neurodegenerativo che colpisce circa il 2% della popolazione dei paesi industrializzati. Il rischio di AD aumenta drammaticamente con l'età, ne è colpito il 10% della popolazione mondiale al di sopra dei 65 anni e la metà di quella con oltre 85 anni, e si stima che l'incidenza di AD aumenterà ulteriormente nei prossimi 50 anni. Diverse aree del SNC vengono danneggiate durante il progredire di questa malattia, tra queste vengono irreversibilmente colpite le regioni cerebrali coinvolte nei processi cognitivi e mnemonici, quali la corteccia temporale e i lobi frontali (Figura 1).



**Figura 1.** Riduzione delle regioni cerebrali coinvolte nell'apprendimento e nella memoria in un cervello affetto da AD. a) Comparazione con un cervello sano: il cervello di una persona affetta da AD mostra una marcata diminuzione dei neuroni del lobo temporale (parte bassa del cervello) e dei lobi frontali (parte sinistra del cervello). b) Le immagini PET mostrano l'uptake del glucosio (i colori rosso e giallo indicano un'elevato riuptake) in un cervello normale ed in uno affetto da AD. Il paziente affetto da AD mostra una drammatica diminuzione del metabolismo energetico nella corteccia frontale (parte alta del cervello) e nei lobi temporali (parti laterali del cervello).



L'AD è virtualmente l'unica PCD caratterizzata dalla contemporanea presenza di placche fibrillari extracellulari ed inclusioni intracellulari. La presenza in grosse quantità di questi depositi, infatti, è la principale caratteristica neuropatologica che viene riscontrata *post mortem* nel cervello di pazienti affetti da AD<sup>5,6</sup>.

Le placche sono costituite principalmente da fibrille e aggregati amorfi di un piccolo peptide di 39-42 amminoacidi, il  $\beta$ -amiloide ( $A\beta$ ), che si ritrova diffuso in molte zone del SNC.

Le inclusioni intracellulari o reticoli neurofibrillari, invece, sono principalmente costituite da una proteina, solitamente associata ai microtubuli, la proteina *Tau*, che in essi si ritrova iperfosforilata ed ossidata.

Placche e reticoli si accumulano principalmente nelle zone del cervello coinvolte nei processi dell'apprendimento, della memoria e dei comportamenti emozionali quali la corteccia entorinale, l'ippocampo, la corteccia basale e l'amigdala. Queste regioni mostrano un ridotto numero di sinapsi ed anche neuriti significativamente danneggiati.

Diversi sono i sistemi neurotrasmettitoriali che vengono alterati da questa patologia, tra questi quello colinergico e quello glutamatergico sono i più colpiti. I neuroni di questi circuiti, infatti, mostrano un danno ossidativo, una diminuzione dell'energia metabolica e l'alterazioni nell'omeostasi del calcio e di altri ioni essenziali per il funzionamento delle cellule.

L'overproduzione di  $A\beta$  e la sua conseguente aggregazione e deposizione in placche sembra essere la principale causa di queste alterazioni. Sebbene, infatti,

questo aspetto sia stato a lungo oggetto di dibattito scientifico, sempre maggiori evidenze sperimentali accertano che è nella “*cascata dell’amiloide*”, ovvero nel complesso meccanismo che conduce all’aggregazione anomala di A $\beta$  in placche fibrillari, la principale causa della patogenesi dell’AD. E’ stato infatti dimostrato che, mentre mutazioni all’interno della proteina precursore dell’amiloide (APP), o in una delle proteasi (prenisila/ $\gamma$ -secretasi) che taglia dall’APP il peptide A $\beta$ , sono in grado di indurre forme precoci e particolarmente aggressive di AD, mutazioni di *Tau* non inducono forme di Alzheimer, sebbene inducano comunque una demenza frontotemporale con parkinsonismo dovuta alla formazione delle inclusioni intracellulari di *Tau*.<sup>7</sup>

Sembra che tanto fattori genetici quanto ambientali influiscano sul rischio di AD. L’identificazione di tali fattori e la delucidazione di quanto essi possano influire sulla *cascata amilodea* potrebbero certamente favorire la prevenzione e il trattamento dell’AD. A tal proposito, la scoperta dell’esistenza di forme ereditarie di AD ed il loro studio hanno consentito, negli ultimi quindici anni, il chiarimento di alcune delle alterazioni cellulari e molecolari responsabili della neurodegenerazione e della disfunzione cognitiva. In particolare, ciò che è emerso è che a monte delle disfunzioni che sottendono all’AD risiede l’alterazione del processo di proteolisi dell’APP che determina l’aumento della produzione e dell’accumulo di A $\beta$ . L’APP, infatti, è una proteina di membrana di tipo I che può fisiologicamente subire due diversi destini attraverso: i) una via amiloidogenica, che determina la produzione di A $\beta$ , in seguito al taglio proteolitico sequenziale di due proteasi, la  $\beta$ -secretasi, che ne libera l’N

terminale, e la  $\gamma$ -secretasi, che ne taglia il C terminale, o ii) una via non amiloidogena, che prevede il taglio della  $\gamma$ -secretasi seguito da quello effettuato ad opera di un'altra proteasi, l' $\alpha$ -secretasi che, tagliando all'interno della sequenza di A $\beta$ , ne previene, chiaramente, la produzione.

E' stato dimostrato che nell'AD ereditario sono presenti mutazioni nella sequenza dell'APP di uno o due amminoacidi all'interno o immediatamente prima della sequenza di A $\beta$  in grado di aumentarne il taglio da parte della BACE e della  $\gamma$ -secretasi, o mutazioni nel gene della presenilina che influiscono negativamente sull'attività della  $\gamma$ -secretasi.<sup>8</sup>

Restano tuttavia da chiarire le cause che invece determinano l'alterazione del metabolismo dell'APP nell'AD sporadico, sebbene si pensi che esse debbano comunque includere fattori legati all'età, quali stress ossidativo, alterazioni del metabolismo energetico e variazioni dell'omeostasi di alcuni ioni.

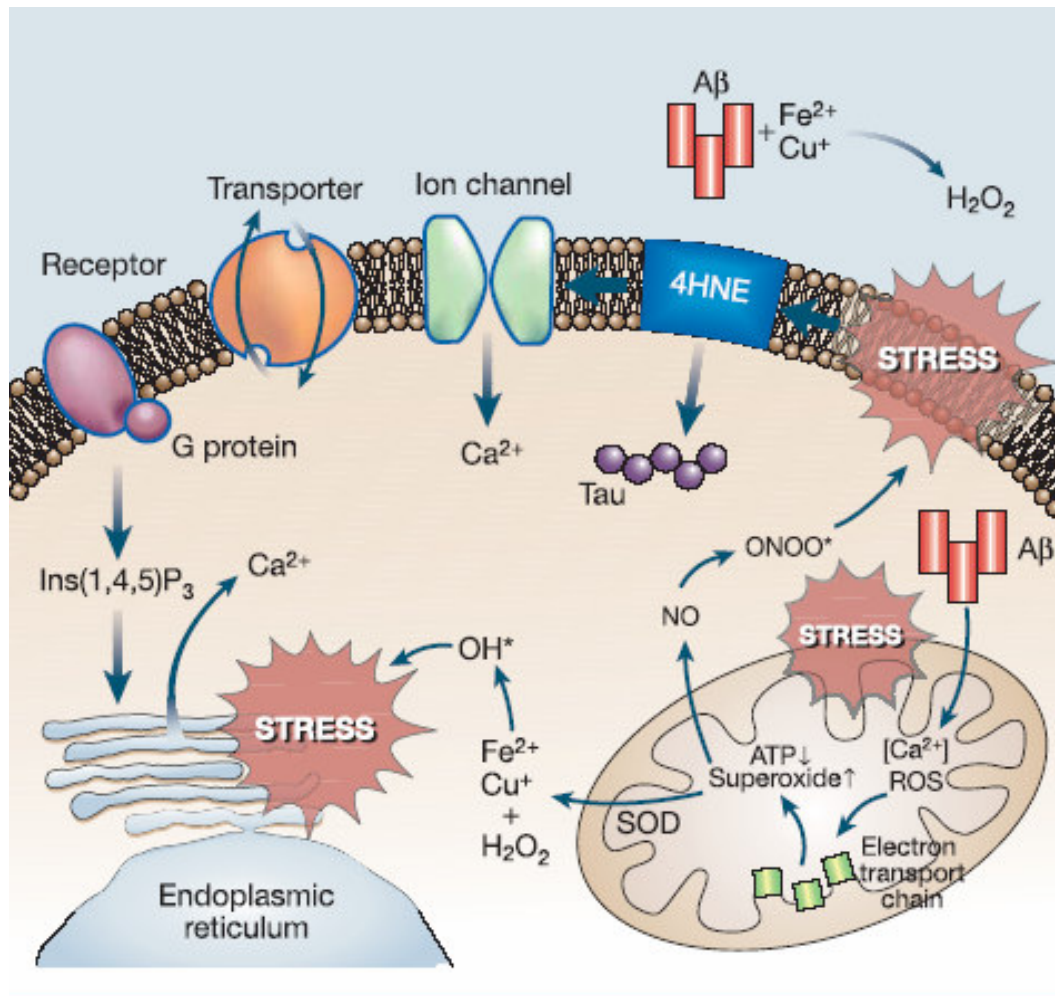
In ogni caso, l'aumento della produzione e la conseguente deposizione di A $\beta$ , che scaturisce da queste alterazioni, determina il danno strutturale e funzionale dei neuroni circostanti sia per la capacità dei depositi fibrillari di A $\beta$  di aumentare, attraverso il danno meccanico, la vulnerabilità dei neuroni allo stress ossidativo e metabolico, sia per l'insorgere di un'attività tossica intrinseca del peptide.<sup>9</sup> Nei cervelli affetti da AD, infatti, si ritrovano grosse quantità di proteine, lipidi e DNA ossidati e si manifestano danni neuronali dovuti alle specie reattive dell'ossigeno (ROS), che si liberano nell'ambiente delle placche che circondano i neuroni.<sup>10</sup>

Diverse evidenze sperimentali indicano che la fonte dei ROS risiede nell'interazione di A $\beta$  con ioni metallici quali Fe<sup>2+</sup> e Cu<sup>2+</sup>, la cui omeostasi risulta particolarmente alterata nell'AD.<sup>11,10,12</sup>

La perossidazione dei lipidi indotta da A $\beta$  inficia sul funzionamento delle ATPasi nel trasporto ionico, dei trasportatori di glucosio e glutammato, e anche delle proteine legate a GTP, come conseguenza delle modifiche covalenti apportate dal 4-idrossinonenale<sup>7</sup> a queste proteine.

L'overproduzione di A $\beta$  e la tossicità che scaturisce dalla sua interazione con gli ioni metallici costituiscono le basi di quella che viene definita *Metallobiologia dell'Alzheimer*,<sup>13</sup> che verrà trattata in dettaglio nel paragrafo successivo.

In ogni caso, la disfunzione e la degenerazione delle sinapsi che si verifica nell'AD sembra proprio essere dovuta allo stress ossidativo indotto da A $\beta$ , poiché l'esposizione delle sinapsi ad A $\beta$  altera l'omeostasi dei metalli ed il metabolismo energetico, e compromette le funzioni mitocondriali attraverso un meccanismo mediato dallo stress ossidativo (Figura 2).



**Figura 2.** L'azione neurotossica di A $\beta$  prevede la generazione di specie di ossigeno reattivo e la distruzione dell'omeostasi del calcio nelle cellule. L'interazione di A $\beta$  con Fe $^{2+}$  o Cu $^{+}$  genera H $_2$ O $_2$ . Quando l'aggregazione di A $\beta$  avviene a livello della membrana cellulare, lo stress ossidativo determina la perossidazione dei lipidi e la conseguente generazione di 4-idrossinonenale (4HNE), un aldeide neurotossica che modifica covalentemente le proteine reagendo con residui di cisterna, lisina ed istidina. Alcune delle proteine modificate dallo stress ossidativo indotto da A $\beta$  sono trasportatori di membrana, recettori, proteine G e canali ionici. L'ossidazione di Tau da parte del 4HNE e di altri ROS ne può promuovere l'aggregazione e formazione delle inclusioni intracellulari. Il superossido viene convertito in H $_2$ O $_2$  dalla SOD o può interagire con l'ossido nitrico attraverso la nitrossido sintasi per produrre perossinitriti. L'interazione della H $_2$ O $_2$  con Fe $^{2+}$  o Cu $^{+}$  genera il radicale ossidrilico, che determina un ulteriore stress sulle membrane circostanti. Immagine presa dal riferimento 7.

## **2. PROGETTAZIONE DI NUOVI AGENTI DIAGNOSTICI E TERAPEUTICI DELL'AD**

## 2.1 INTRODUZIONE

### *2.1a Metallobiologia del Morbo di Alzheimer*

Numerosi studi hanno evidenziato che la principale causa dell'insorgere e del progredire della malattia di Alzheimer risiede nell'aggregazione di A $\beta$  e nella generazione dei ROS, ed entrambi i fenomeni risultano essere conseguenza della capacità del peptide di coordinare ioni metallici quale Zn\*, Cu\* e Fe\*.

Le placche fibrillari tipiche dell'AD risultano essere dei veri e propri “depositi di metalli”, dal momento che in esse si riscontrano elevate concentrazioni di Cu\* (400  $\mu$ M), Zn\* (1mM) e Fe\* (1mM).<sup>14,15</sup> Gli eccellenti risultati ottenuti in animali transgenici e in fase clinica utilizzando un chelante a bassa affinità dei metalli, oralmente disponibile, quale il cliochinolo, evidenziano ancora di più l'importanza degli ioni metallici nella patogenesi dell'AD. Tali dati, inoltre, avvalorano sempre di più l'ipotesi che la regolazione della omeostasi di questi ioni metallici nel SNC costituisca il ruolo fisiologico del peptide stesso.

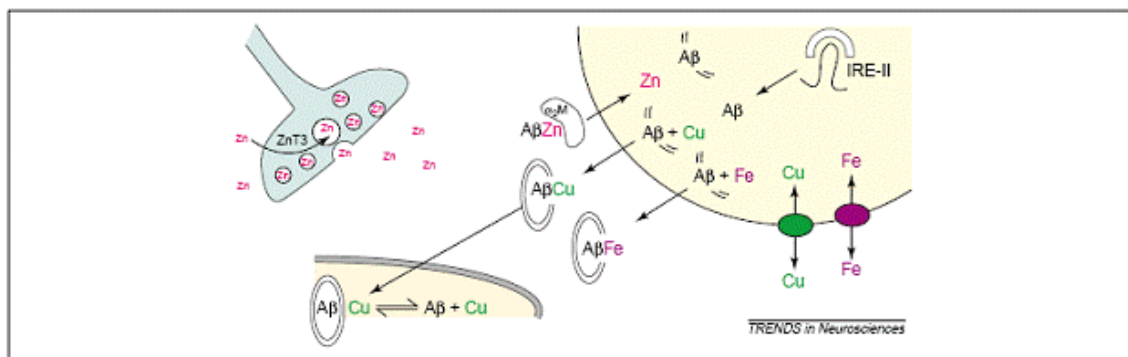
A conferma di ciò, A $\beta$  possiede un sito ad elevata affinità per lo Zn\* ed il Cu\*, e studi in vitro dimostrano che esso è in grado di prevenire la perossidazione dei lipidi delle proteine a bassa densità ad opera del Cu<sup>2+</sup> e la morte cellulare indotta dal Fe<sup>3+</sup>.<sup>16,17</sup>

---

\* I simboli chimici per lo zinco (Zn), rame (Cu) e Ferro (Fe) si riferiscono ai metalli nel loro stato ionico, per i quali Cu e Fe possono trovarsi in più di uno stato di valenza (Cu<sup>+</sup> o Cu<sup>2+</sup> e Fe<sup>2+</sup> o Fe<sup>3+</sup>, rispettivamente).

E' chiaro quindi che durante la malattia di Alzheimer si verifica una drammatica alterazione dell'interazione fisiologica di A $\beta$  con gli ioni metallici. Mentre infatti il ruolo protettivo di A $\beta$  potrebbe essere ascrivito alla semplice chelazione dei metalli coinvolti (Figura 1), ed alla formazione di aggregati solubili, il ruolo patologico di A $\beta$  nell'AD è certamente riconducibile alle reazioni di tipo redox a cui esso può dar luogo in seguito all'alterata interazione con questi metalli, che a sua volta conduce alla formazione di aggregati non più solubili ed alla conseguente attività tossica, responsabile della neurodegenerazione.

A $\beta$  nel SNC esiste in tre frazioni biochimiche: associato alle membrane, aggregato ed in soluzione. Mentre negli individui sani, una grossa frazione di A $\beta$  si trova associato alle membrane<sup>17,18</sup> (dove si struttura ad  $\alpha$ -elica), nei pazienti affetti da Alzheimer, esso si trova principalmente in forma di aggregati presenti in soluzione (fibrille) o precipitati (placche).



**Figura 1.** Modello per la metallobiologia non patologica del  $\beta$ -amiloide (A $\beta$ ). Ipotesi delle interazioni fisiologiche dell'A $\beta$  con i biometalli nel cervello. L'espressione dell'A $\beta$  promuove l'efflusso di Cu<sup>2+</sup> e di Fe<sup>2+</sup> dalle cellule corticali e l'entrata di Zn<sup>2+</sup>.<sup>18</sup> La maggior parte del A $\beta$  è normalmente associata alle membrane<sup>18</sup> ed i complessi di A $\beta$  inseriti nella membrana potrebbero rappresentare la strutturazione fisiologica per trasportare Cu<sup>2+</sup> e Zn<sup>2+</sup>.<sup>19,20</sup>



Studi in vitro dimostrano che sia lo  $Zn^{*}$  che il  $Cu^{*}$  sono in grado di indurre l'aggregazione di  $A\beta$ , il primo in un vasto intervallo di valori di pH, il secondo in condizioni leggermente acide (pH 6.0-7.0).<sup>21</sup>

In un cervello sano, la concentrazione dei metalli è finemente regolata dal loro trasporto attraverso la barriera ematoencefalica (BBB), che rende il SNC relativamente insensibile alle fluttuazioni dei livelli degli ioni metallici nel sangue.

Con l'invecchiamento, selettività e permeabilità della BBB risultano meno efficienti e questo determina, di conseguenza, variazioni nei livelli di diversi ioni metallici (tra cui  $Cu^{*}$ ,  $Zn^{*}$  e  $Fe^{*}$ ) con conseguente alterazione della loro omeostasi. Sia l'alterazione della permeabilità della membrana, sia l'aumento dei livelli di  $[Cu^{*}]$  e  $[Zn^{*}]$ , determinano una diminuzione del pH, generando così il microambiente ideale per fenomeni di misfolding delle proteine nonché per reazioni ossido-riduttive fra  $A\beta$  e il  $Cu^{2+}$ .

È chiaro che questo scenario favorisce l'aggregazione dell' $A\beta$  e la sua deposizione in placche, che a causa di fenomeni di tipo redox che portano alla formazione di legami covalenti tra più peptidi  $A\beta$  non sono più risolubilizzabili.

Il meccanismo patogeno che ne scaturisce, prevede, infatti, una serie di reazioni a cascata che conducono alla produzione di  $H_2O_2$  e all'ossidazione di  $A\beta$ , con formazione di legami crociati covalenti tra le fibrille all'interno delle placche che ne determinano la tossicità. In particolare, probabilmente per sopperire all'aumentato livello degli ioni metallici, nell'AD si manifesta un'iperproduzione dell'APP e di

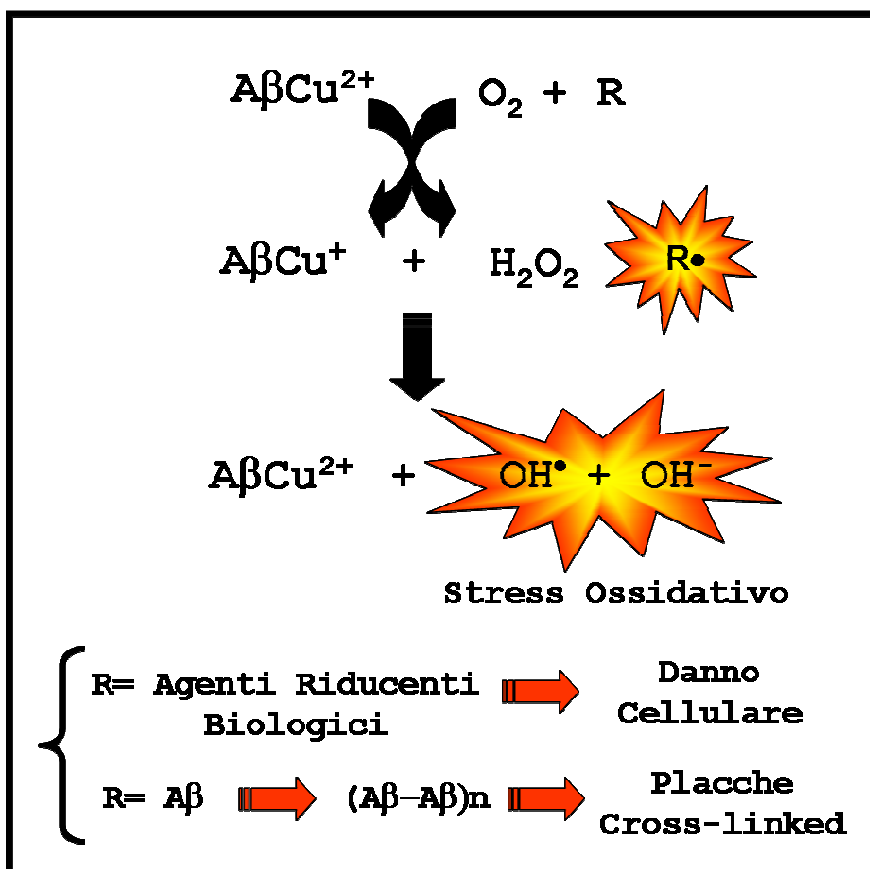
A $\beta$ , il quale va incontro ad ipermetallazione, facilitata dall'ambiente acido, via via che le concentrazioni di Cu\* e Zn\* aumentano.<sup>22</sup>

È stata dimostrata, infatti, l'esistenza di un sito a bassa affinità su A $\beta$  per il Cu<sup>2+</sup> che si rende “disponibile” in particolari condizioni ambientali. In questo modo il peptide ipermetallato utilizza O<sub>2</sub> e agenti riducenti biologici (colesterolo, acido ascorbico o catecolammine, Met35 di A $\beta$ ) per produrre H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>23</sup> utilizzando quindi il metallo come catalizzatore similmente agli enzimi. Alternativamente è possibile che A $\beta$  trasferisca un elettrone al Cu<sup>2+</sup> per la sua riduzione a Cu<sup>+</sup> formando un radicale (A $\beta$ <sup>\*</sup>), utilizzando in questo caso il metallo come partner della reazione redox. Nel caso in cui A $\beta$  funga esso stesso da substrato riducente, il radicale generato potrebbe dar luogo alla formazione e precipitazione degli aggregati legati covalentemente [(A $\beta$ - A $\beta$ )<sub>n</sub>]. Il possibile sito di ossidazione di A $\beta$  sembra essere il residuo di Met35, che diversi studi dimostrano essere essenziale per la riduzione del Cu<sup>2+</sup> e per la neurotossicità del peptide. In qualsiasi caso, l'alto potenziale riducente del complesso A $\beta$ Cu<sup>2+</sup> (+550 mV) determina la riduzione dell'O<sub>2</sub> ad O<sub>2</sub><sup>-</sup> che viene successivamente convertito in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Tale processo viene potenziato dalla presenza di agenti riducenti biologici (Vitamina C, Dopamina, colesterolo). Il colesterolo, per esempio, è stato ritrovato essere un ottimo substrato per la produzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, suggerendo una risposta al perché l'uso di statine possa essere un fattore di rischio per l'AD.

A $\beta$  penetra le membrane lipidiche quando legato a Cu<sup>2+</sup> e Zn<sup>2+</sup> ed in queste condizioni esso potrebbe utilizzare direttamente il colesterolo per generare il perossido di idrogeno.

L'interazione alterata tra A $\beta$  e i metalli porta quindi ad un'amplificazione del processo degenerativo a causa delle reazioni redox scatenate a catena che portano alla formazione dei ROS attraverso la reazione di Fenton Haber Weiss (Schema 1).<sup>23,24</sup>

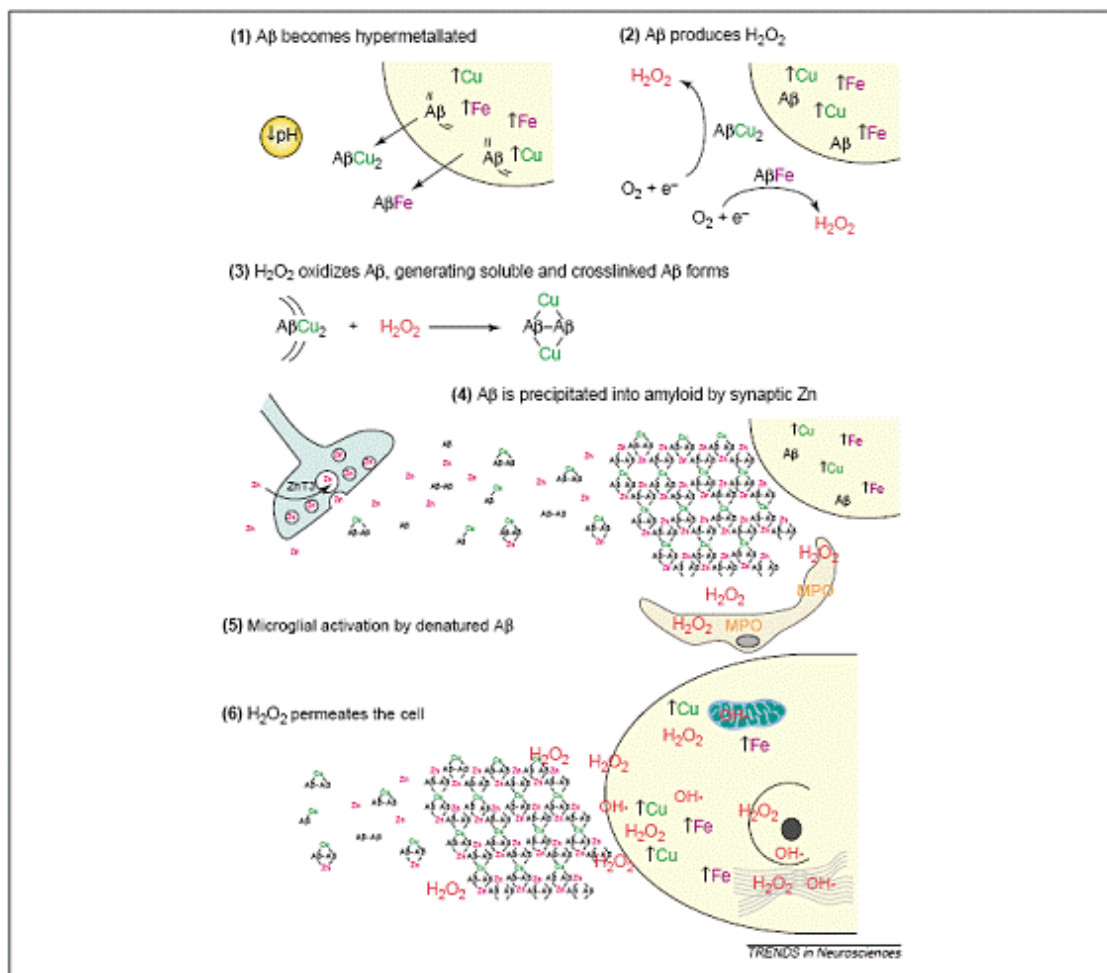
**Schema 1.** Schema generale del possibile meccanismo di reazione responsabile della formazione dei ROS e di speci radicaliche alchilanti.



In questo scenario, si generano anche forme ossidate e *crosslinked* di A $\beta$  che accumulandosi nei depositi fibrillari innescano l'attivazione della microglia, che reagisce producendo a sua volta  $H_2O_2$  e mieloperossidasi (MPO).<sup>25</sup>

Va infine sottolineato che il perossido di idrogeno rappresenta una minaccia anche per l'ambiente intracellulare dei neuroni circostanti, in quanto non essendo una molecola polarizzata, penetra facilmente la membrana cellulare andando a reagire con  $\text{Cu}^*$  e  $\text{Fe}^*$ , in eccesso nel fenomeno patologico, per generare altri ROS (Figura 2).

I radicali ossidrilici ( $\text{OH}^\cdot$ ) che si formano sono in grado di determinare successive reazioni redox che comportano: i) perossidazione dei lipidi di membrana; ii) formazione di addotti con acidi nucleici come l'8-OH-guanosina; iii) attacco del peptide di  $\text{A}\beta$  da parte del radicale  $\text{OH}^\cdot$  e iv) ossidazione di proteine e amminoacidi.



**Figura 2.** Modello per la metallo-biologia del β-amiloide (Aβ) nel morbo di Alzheimer (AD). Sequenza proposta degli eventi biochimici che conducono all'AD. (1) Le concentrazioni di Fe\* e di Cu\* aumentano con l'incremento dell'età nella corteccia del cervello.<sup>18</sup> Ciò conduce ad una sovrapproduzione della proteina precursore dell' amiloide (APP) e dell'Aβ nel tentativo di sopprimere i livelli cellulari degli ioni metallici. Se i livelli degli ioni metallici continuano ad aumentare, accade l'iper-metallazione dell'Aβ facilitata da una leggera acidosi.<sup>26,27</sup> (2) Alcune forme di Aβ "iper-metallato" catalizzano la produzione di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> dall'O<sub>2</sub> e da agenti riducenti biologici.<sup>28</sup> (3) AβCu<sup>+</sup> reagisce con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> per generare le forme ossidate ed unite con legami crociati che vengono poi liberate dalla membrana. L'ossidazione dell'Aβ lo fa divenire proteasi-resistente. (4) Queste forme ossidate dell'Aβ sono i componenti principali dei depositi delle placche.<sup>29</sup> Il rilascio dell'Aβ solubile rende disponibile il peptide per la precipitazione, a causa delle alte concentrazioni di Zn\* liberate nelle vicinanze delle sinapsi. Le placche sono quindi costituite da un co-precipitato di Aβ con alte concentrazioni di Zn\*, Cu\* e Fe\*. (5) L'Aβ ossidato inizia l'attivazione microgliale. La microglia tipicamente reagisce producendo alte concentrazioni di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e mieloperoxidasi (MPO),<sup>25</sup> che promuove ulteriormente la costituzione di legami covalenti crociati fra Aβ e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> all'esterno delle cellule corticali. (6) L'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> passa per diffusione attraverso la membrana lipidica e penetra dall'esterno della cellula nei compartimenti cellulari, dove reagisce con Cu\* ed il Fe\* (i livelli dei quali sono innalzati a causa dell'età), causando la produzione del radicale idrossile (OH•), altamente reattivo, e l'ossidazione degli acidi nucleici, delle proteine e dei lipidi, che caratterizzano il tessuto del cervello affetto da AD. L'ossidazione di *tau* potrebbe condurre alla sua aggregazione ed allo sviluppo di ulteriori siti per gli ioni metallici che catalizzano reazioni redox all'interno della cellula (non mostrato).<sup>30</sup>

### ***2.1b Modalità di legame di A $\beta$ con i Metalli.***

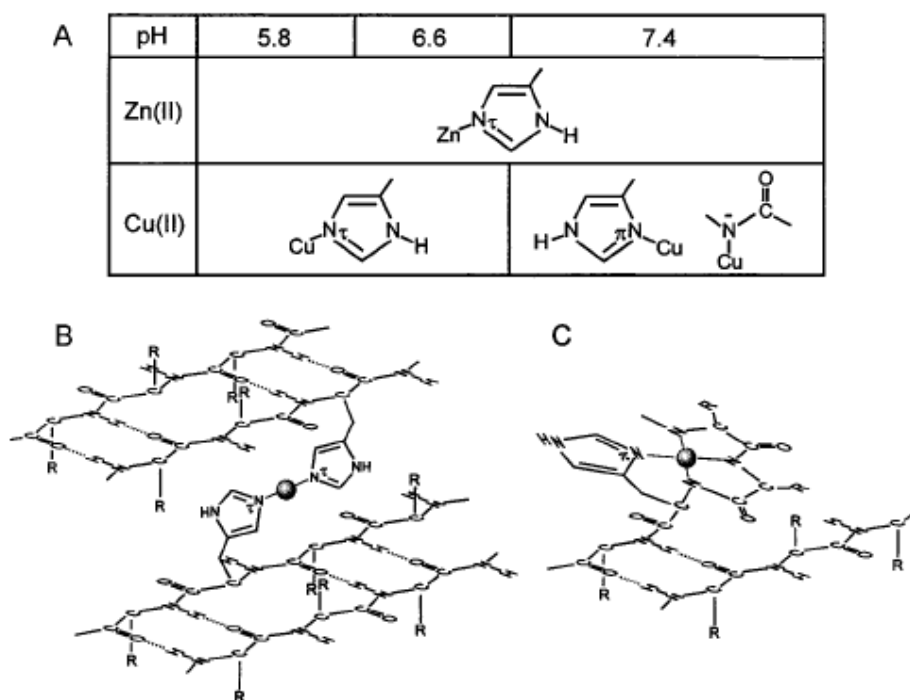
Modifiche chimiche e studi di mutagenesi hanno provveduto a dare alcune informazioni sul sito di legame dei metalli presente su A $\beta$ .

L'abilità del peptide di legare Zn\* e Cu\* viene infatti significativamente diminuita se si mutano tre residui di His (H6, H13 e H14) presenti nella sua porzione N terminale. In accordo con ciò, A $\beta$  di ratto che presenta la mutazione di una di queste His (H13R), presenta una minore affinità per Zn\* e Cu\* e conseguentemente questi animali non vengono colpiti dall'AD. La ridotta affinità di A $\beta$  di ratto per Cu\* e Zn\* può essere riprodotta effettuando la mutazione inversa sul peptide umano.

Va sottolineato comunque che non è inusuale che proteine ed enzimi del nostro organismo utilizzino gli atomi di azoto dell'anello imidazolico dell'istidina (N $\tau$  ed N $\pi$ , Figura 1) per la coordinazione dei metalli.

Gli studi di spettroscopia Raman hanno tuttavia consentito la distinzione nel legame del metallo tra N $\tau$  ed N $\pi$  e hanno evidenziato una correlazione tra il legame ad essi e la formazione di aggregati di diversa natura. Il legame, infatti, all'atomo di azoto imidazolico N $\tau$  determina la formazione di aggregati insolubili, mentre il legame all'atomo di azoto N $\pi$  dell'istidina così come al suo azoto ammidico conducono alla formazione di complessi solubili.<sup>21</sup> Negli studi di Miura et al, è stato riportato che mentre lo Zn<sup>2+</sup> lega A $\beta$  sempre attraverso N $\tau$  indipendentemente dal valore del pH del mezzo, il Cu<sup>2+</sup> discerne tra questi due siti a seconda del pH (Figura 1). In particolare, il Cu<sup>2+</sup> utilizza N $\pi$  a pH neutro (7.2) determinando quindi la

formazione di aggregati solubili, mentre in condizioni leggermente acide utilizza anch'esso  $N\tau$  per la coordinazione del metallo. Il passaggio tra questi due differenti tipi di legame giustifica la forte dipendenza dal pH dell'aggregazione di A $\beta$  indotta dal  $Cu^{2+}$ .



**Figura 1.** Modalità di legame di A $\beta$  ai metalli. A) Dipendenza da pH dei siti di legame di A $\beta$  per  $Zn^{2+}$  e  $Cu^{2+}$ . B) un possibile modello per la formazione di aggregati insolubili di  $Zn^{2+}$  e  $Cu^{2+}$ -A $\beta$  formati in condizioni rispettivamente di pH leggermente e mediamente acide. I  $\beta$ -sheet formati da A $\beta$  sono uniti da legami crociati formati dai ponti His( $N\tau$ )-Me-His( $N\tau$ ). C) Modello di complesso solubile A $\beta$   $Cu^{2+}$  a pH neutro. Lo ione  $Cu^{2+}$  viene coordinato da l' $N\pi$  di un residuo di His e da tre N ammidici deprotonati. Non si verificano in questo complesso legami crociati tra i peptidi. Nelle figure B) e C) metallo è mostrato come una sfera.

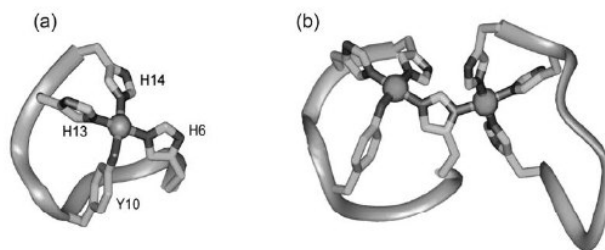
A pH neutro infatti, il sito di coordinazione per il  $Cu^{2+}$  su A $\beta$  è costituito dall' $N\pi$  di un residuo di His e da due o tre atomi di azoto ammidici vicini. E' lo stesso metallo, infatti, ad indurre la deprotonazione degli azoti ammidici in seguito al

legame con il residuo di istidina. La geometria di chelazione che ne risulta è tetragonale e distorce la struttura del peptide (Figura 1B). Quando invece, in condizioni acide, il legame di coordinazione viene spostato sull'atomo  $N\tau$  si rende possibile la formazione di ponti istidinici  $\text{His}(N\tau)\text{-Me-His}(N\tau)$  tra diversi peptidi che ne determinano la conseguente auto-aggregazione nonché il suo passaggio da struttura *random coil* a struttura a  $\beta$ -sheet (Figura 1C). Studi di dicroismo circolare confermano quanto illustrato, infatti, l'aggiunta di  $\text{Cu}^{2+}$  ad una soluzione contenente  $\text{A}\beta_{1-40}$  con la posizione  $N\pi$  di una delle istidine bloccata attraverso metilazione, inducono la conformazione a  $\beta$ -sheet del peptide mentre la coordinazione sull'atomo  $N\pi$ , ottenuta mediante metilazione dell'atomo  $N\tau$  dell'istidine, non produce alcuna struttura secondaria (*random coil*).

E' chiaro che le condizioni patologiche che si verificano nell'AD, quali aumentati livelli degli ioni metallici e conseguente acidificazione dell'ambiente, determinano la coordinazione di  $\text{Cu}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$  da parte di  $\text{A}\beta$  attraverso  $N\tau$  e, conseguentemente, inducono l'aggregazione e la deposizione del peptide.

Studi NMR ed EPR hanno tuttavia evidenziato che in condizioni di aumentati livelli di ioni metallici,  $\text{A}\beta$  espone un ulteriore sito di coordinazione ai metalli, vicino a quello iniziale, ed altamente cooperativo con esso. Questo secondo sito è costituito da un residuo di His che questa volta utilizza simultaneamente  $N\tau$  ed  $N\pi$  per coordinare due metalli risultando così in un ponte  $\text{Me-(N}\tau\text{)His(N}\pi\text{)-Me}$  (Figura 2).<sup>31</sup>





**Figura 2.** Coordinazione del  $\text{Cu}^{2+}$  da parte di  $\text{A}\beta$ . a) La coordinazione N3O formata dalle catene laterali di tre residui di His e uno di Tyr e b) una catena laterale di His fa da ponte tra due atomi di  $\text{Cu}^{2+}$  generando un sito attivo simile a quello di SOD I.

Va evidenziato che è il legame dello stesso metallo all'atomo  $\text{N}\pi$  a ridurre il  $\text{pK}_a$  dell'atomo  $\text{N}\tau$ , facilitando così la coordinazione del secondo ione metallico. La sfera di coordinazione che così si viene a formare risulta essere estremamente simile a quella presente nella Cu/Zn Superossido Dismutasi I, l'enzima che nel nostro organismo catalizza la reazione di dismutazione del superossido ad  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Figura 2).

## 2.2 SCOPO DEL LAVORO

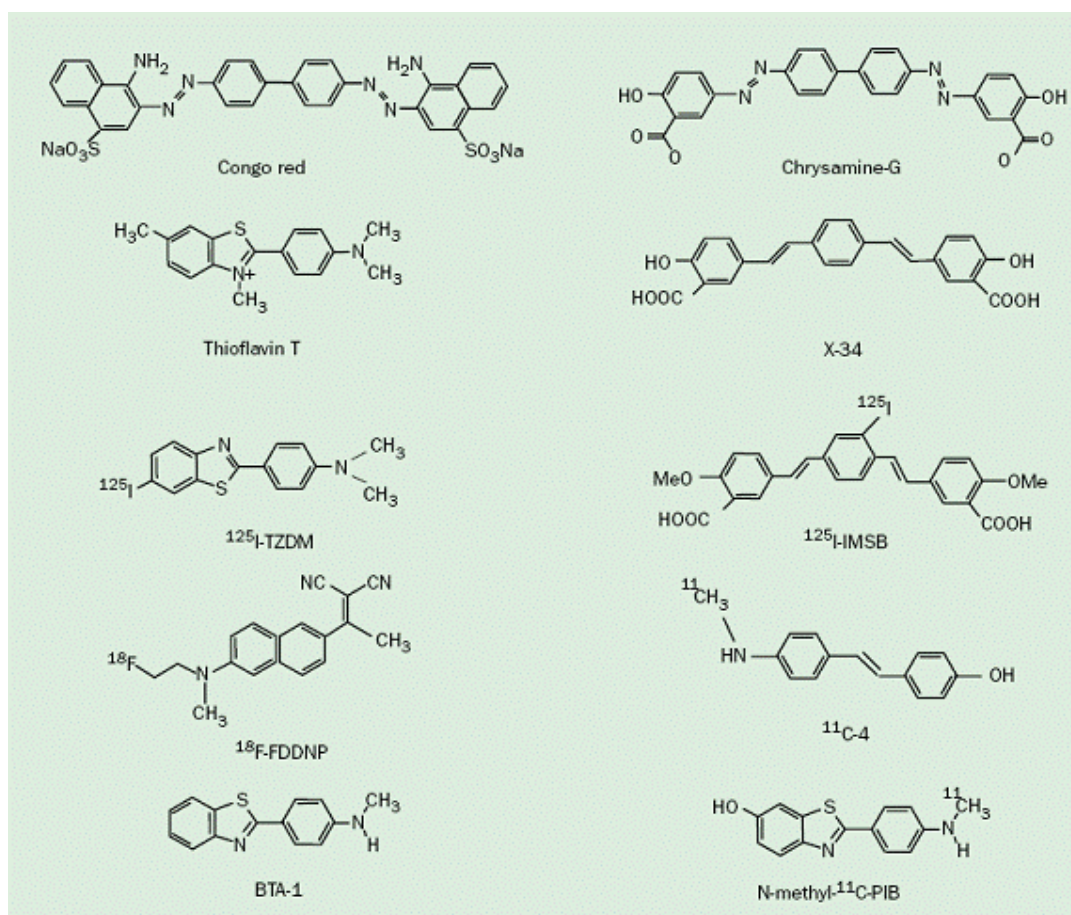
### 2.2a *Diagnostici di Imaging per l'AD*

A causa dei seri danni funzionali apportati, del costo delle cure e dell'impatto emozionale sulle famiglie dei malati, è chiaro che vi è un'enorme interesse, nonché urgenza, nello sviluppo di terapie efficaci che allevino gli effetti distruttivi del Morbo di Alzheimer.

Attualmente è possibile effettuare la diagnosi di tale patologia solo quando essa raggiunge il suo stadio più avanzato, quando cioè, i danni apportati al SNC sono ormai tali da aver determinato un elevato grado di neurodegenerazione.

Ad oggi, la diagnosi clinica dell'AD, quando il paziente è ancora in vita, può essere effettuata solo attraverso metodi indiretti, quali: i) l'analisi dello stato mentale e fisico del paziente; ii) l'accertamento neurologico; iii) i test di valutazione delle disfunzioni cognitive. Una diagnosi indiretta di questo tipo, che punta ad un'analisi sintomatica della patologia, può portare ad un'identificazione non precisa e incerta del disturbo, avendo le patologie neurodegenerative una sintomatologia piuttosto simile tra loro.

La diagnosi certa di AD è possibile quindi effettuarla soltanto *post-mortem* attraverso l'individuazione delle placche fibrillari e dei reticoli neurofibrillari mediante l'utilizzo di marcatori specifici quali la tioflavina T (ThT) o il congo-red (Figura 1).



**Figura 1.** Struttura dei marcatori per imaging delle fibrille amiloidee post-mortem.

Alla luce di quanto illustrato emerge sempre di più la necessità di indirizzare la ricerca farmaceutica verso lo sviluppo di nuovi composti che consentano la diagnosi in vita della malattia di Alzheimer.

E' chiaro che marcatori selettivi dell'AD, potrebbero consentire, oltre alla diagnosi della patologia, anche di:

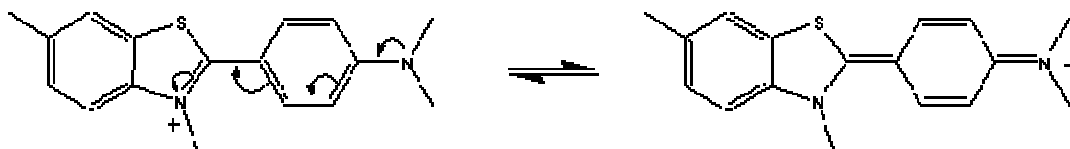
- Monitorare il progredire della patologia.
- Stimare l'efficacia delle nuove terapie utilizzate nel trattamento del morbo di Alzheimer.

- Distinguere accuratamente tra il normale invecchiamento, ed il leggero danneggiamento cognitivo ad esso correlato, ed i sintomi più gravi e drammatici dell'AD.

Infine, dato l'assenza di agenti terapeutici in grado di far regredire questa patologia, si rende sempre più urgente anche la progettazione di composti in grado di indurre la dissoluzione e/o di impedire la formazione delle placche amiloidee.

### ***2.2b Progettazione di Nuovi Agenti Diagnostici e Terapeutici.***

La tioflavina T (ThT), un colorante istologico, è la sonda fluorescente più comunemente utilizzata per identificare post-mortem la presenza delle placche senili dell'AD. Tale composto, infatti, lega le fibrille amiloidee lungo il loro asse principale e in questo microambiente manifesta un'emissione di fluorescenza significativamente superiore a quanto avviene in soluzione, consentendo, così, l'analisi quantitativa delle fibrille di A $\beta$ . Questo particolare comportamento della ThT sembra essere dovuto all'alta coniugazione esistente tra l'anello benzotiazolico e quello benzaminico nella conformazione che la ThT è costretta ad assumere nell'ambiente idrofobico ed ingombrante delle fibrille amiloidee. In tale ambiente, infatti, la rotazione lungo l'asse di congiunzione dei due anelli è impedita dall'ingombro sterico delle catene laterali dei residui amminoacidici delle fibrille di A $\beta$  e, conseguentemente, la transizione radiativa con emissione di fluorescenza, dovuta al trasferimento di carica intramolecolare, risulta più efficiente (Figura 1).



**Figura 1.** Transizione di carica tra gli anelli aromatici della ThT.

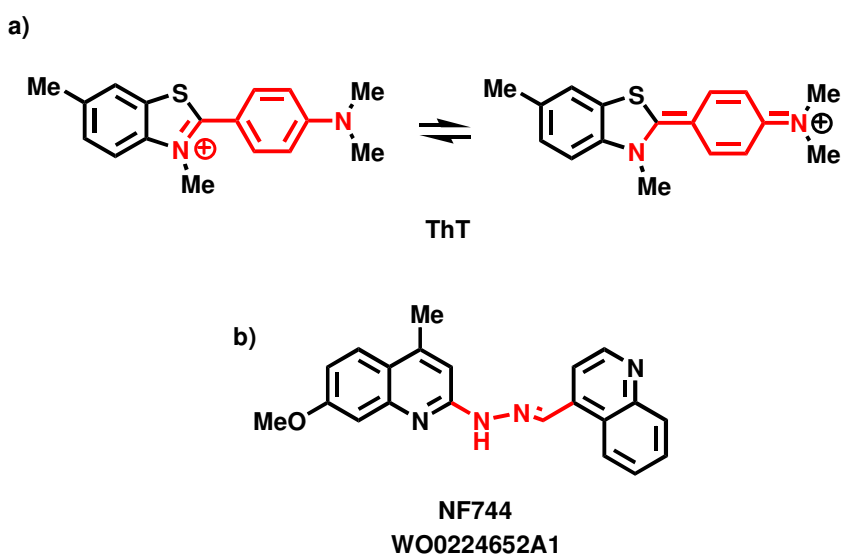
E' stato tuttavia dimostrato che l'intensità di fluorescenza della ThT varia al variare del grado di impacchettamento, e quindi dello stato di aggregazione, delle fibrille di A $\beta$ . In particolare, Lockart e i suoi collaboratori<sup>32</sup> hanno scoperto che esistono tre siti diversi di interazione per la ThT su A $\beta$  1-40, chiamati rispettivamente BS1, BS2 e BS3, corrispondenti alle forme di aggregazione a 30(A $\beta$ ), 4(A $\beta$ ) e 300 (A $\beta$ ), rispettivamente. Dal legame e dalla diversa affinità della ThT per questi siti dipende la variazione dell'intensità della fluorescenza. E' chiaro che questa particolare caratteristica della ThT è particolarmente interessante dal punto di vista diagnostico, poiché poter usufruire di agenti in grado di legarsi a forma diverse di aggregati di A $\beta$ , potrebbe consentire non solo la diagnosi dell'AD ma anche il suo monitoraggio.

L'incapacità, tuttavia, della ThT di superare la BBB costituisce ne impedisce l'utilizzo terapeutico e, conseguentemente, evidenzia l'urgenza di sviluppare agenti in grado di diagnosticare in vita l'AD. Dato, inoltre, il dimostrato coinvolgimento di alcuni ioni metallici nell'attività tossica di tipo redox di A $\beta$ , e le riconosciute potenzialità dell'utilizzo di agenti chelanti a bassa affinità nel trattamento dell'AD, si fa sempre più significativa l'ipotesi di sviluppare agenti che presentino contemporaneamente all'attività diagnostica anche proprietà terapeutiche specifiche,

quali la chelazione dei metalli e/o la capacità di competere per i siti presenti su A $\beta$  per i metalli, così da inibire a monte il processo di aggregazione e neurodegenerazione che si manifesta in questa patologia.

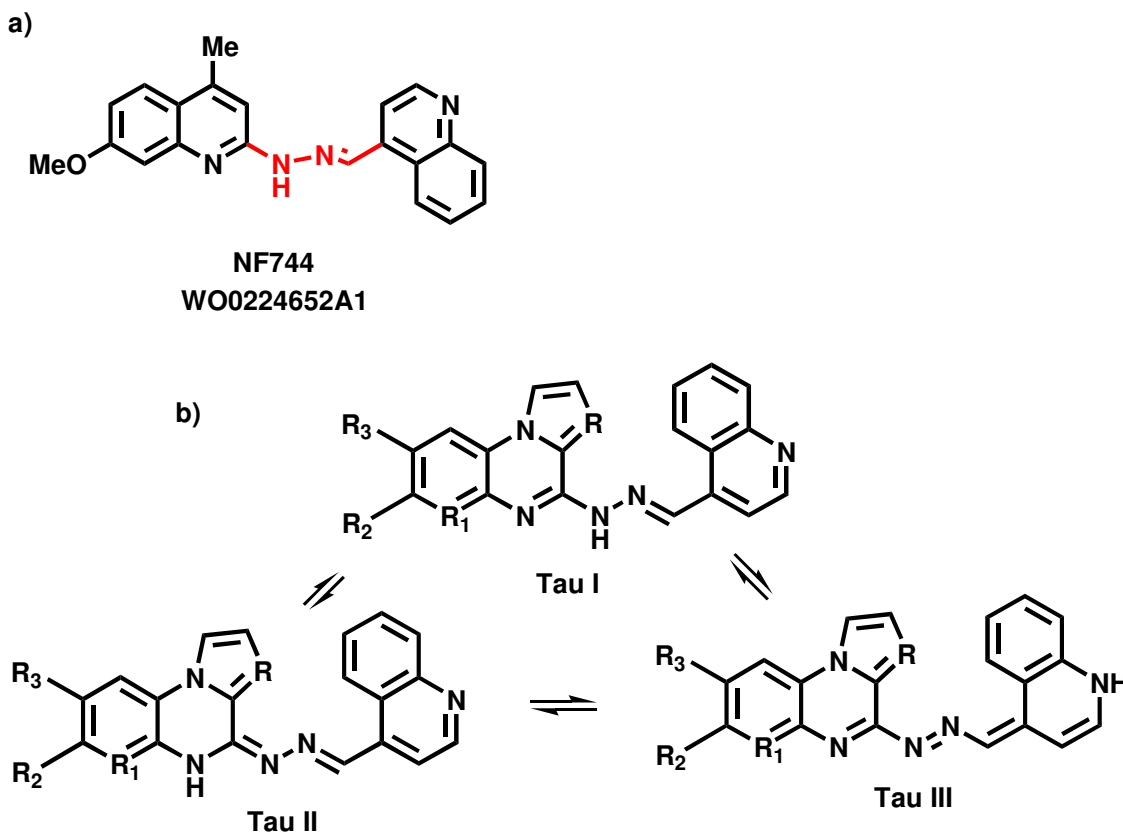
Alla luce di queste conoscenze, il mio lavoro di ricerca è stato dedicato alla progettazione di nuovi agenti terapeutici e diagnostici dell'AD, partendo proprio dalle proprietà chimico-fisiche della ThT e dalle potenzialità terapeutiche ad esse associate.

In particolare, allo scopo di riprodurre le proprietà elettroniche della ThT, nei composti progettati è stato introdotto un linker idrazonico di connessione tra due sistemi aromatici altamente polarizzati (Figura 2), al fine di garantire una forte coniugazione tra essi e quindi la possibilità di avere le transizioni elettroniche responsabili della fluorescenza, fondamentale per l'attività diagnostica, evitando, tuttavia, la presenza della carica positiva della ThT, che inficia l'attraversamento della BBB.



**Figura 2.** a) Strutture di risonanza della ThT responsabili della fluorescenza. b) Struttura dei nuovi composti di imaging (NF744, WO0224652A1).

Inoltre, al fine di implementare ulteriormente la fluorescenza, nei nuovi composti è stata introdotta anche la probabilità di avere diverse forme tautomeriche, così da sostituire alla fluorescenza per trasferimento di una carica netta della ThT la fluorescenza proveniente da più transizioni elettroniche (Figura 3). La presenza del linker idrazonico, inoltre, consente di aumentare l'affinità per le fibrille di A $\beta$ , poiché esso può potenzialmente instaurare interazioni più forti e specifiche con A $\beta$ , in particolare con quei residui amminoacidici coinvolti nel legame con i metalli e quindi con l'attività tossica del peptide.



**Figura 5.** a) Struttura del composto NF744. b) Possibili tautomeri dei nuovi composti progettati.

Infine, alla luce della comprovata alterazione dell'omeostasi dei metalli nell'AD e delle potenzialità terapeutiche associate alle relative terapie chelanti, la specificità

dell'attività terapeutica, addizionale a quella diagnostica, potrebbe essere garantita nei nuovi composti sviluppati dalla presenza in essi di gruppi chelanti gli ioni metallici.



## 2.3 MATERIALI E METODI

Tutti gli studi di modellistica molecolare sono stati eseguiti su calcolatori Silicon Graphics (SGI Origin 200 8XR12000, SGI Octane 2 e Octane).

### *2.3a Determinazione delle proprietà chimico-fisiche dei composti sviluppati*

I composti **NF744**, **NF757**, **NF758**, **NF940**, **NF952**, **NF953**, **NF959**, **NF960** e la ThT sono stati costruiti utilizzando il modulo Builder in Insight 2005 (Accelrys, San Diego). Le strutture cristallografiche del N-(4-metilchinolin-2-il)-N'-(fenilpiridin-2-ilmetilene)idrazina (codice CSD: JAPBUY) e del cliochinolo in complesso con lo  $\text{Zn}^{2+}$  e con il  $\text{Cu}^{2+}$  sono state scaricate utilizzando il programma ConQuest 1.9 della Cambridge Structural Database (codici CSD: NABMAF e NABMEJ, rispettivamente).

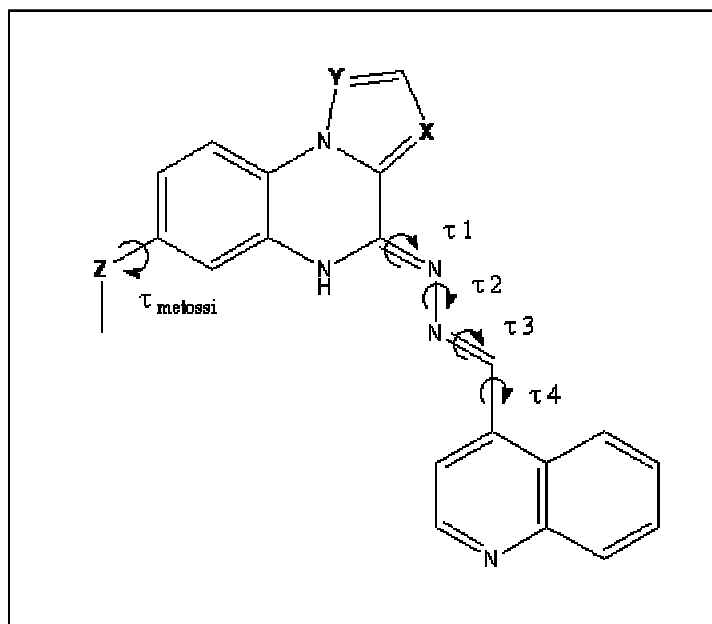
I valori apparenti di pKa dei composti progettati, nelle tre possibili forme tautomeriche, sono stati calcolati utilizzando il software ACD/labs pKa DB 10.00 (Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Canada). Sebbene nei calcoli effettuati siano state considerate le specie ioniche prevalenti a pH fisiologico (7.2), sono state calcolati i valori di pKa anche a pH 5.0 al fine di analizzare le possibili variazioni delle specie ioniche in condizioni acide.

Tutti i calcoli di meccanica e i calcoli semiempirici (MM, AM1 e PM3) sono stati eseguiti usando il campo di forza CVFF.<sup>61</sup>

Per la ThT, in entrambe le forme di risonanza possibili, sono state considerate le cariche parziali assegnate dal metodo semiempirico MNDO<sup>62</sup> 1SCF.

Lo spazio conformazionale per ciascun composto, nelle tre possibili forme tautomeriche, e per la ThT, è stato campionato attraverso 200 cicli di *Simulated Annealing* (campo di forza CVFF<sup>61</sup>) utilizzando il protocollo di seguito descritto. Una temperatura iniziale di 1000K è stata applicata al sistema per 2000 fs (time step = 3.0 fs) al fin di superare tutte le barriere torsionali, successivamente la temperatura è stata ridotta a 300K in 1000 fs con un decremento di 0.5 K/fs (time step=1 fs). Le strutture risultanti sono state sottoposte a minimizzazione energetica utilizzando il modulo Discover\_3 di Insight 2005 (campo di forza CVFF, algoritmo di calcolo Conjugate Gradient,<sup>64</sup> costante dielettrica  $\epsilon=80 \cdot r$ ) fino ad un valore di RMS (deviazione quadratica media) della derivata massima minore di 0.001 kcal/ Å. I conformeri così ottenuti sono stati classificati in base al valore della loro energia.

Una dettagliata analisi (modulo Analysis di Insight 2005) e, conseguentemente, un'ulteriore classificazione strutturale è stata eseguita sulla base dei valori dei torsionali  $\tau_{\text{metossi}}$ ,  $\tau_1$ ,  $\tau_2$ ,  $\tau_3$  e  $\tau_4$ , rappresentati in Figura 1, calcolati per ciascun conformero attraverso l'utilizzo di una macro in linguaggio bcl sviluppata presso il laboratorio dove ho svolto il mio lavoro di dottorato. Questi valori sono stati successivamente raccolti in una matrice contenente: a) conformero; b) valore energetico; c) valore degli angoli torsionali.



**Figura 1.** Definizione dei torsionali utilizzati nella classificazione strutturale dei composti ottenuti.

Sulla base dei valori dei torsionali considerati, i conformeri ottenuti sono stati suddivisi in famiglie, e, successivamente, i minimi energetici di ogni famiglia sono stati sottoposti ad una completa ottimizzazione geometrica (*full-geometry-optimization*) applicando i metodi quanto-meccanici AM1 e PM3 (Mopac 6.0) compresi nel modulo Ampac/Mopac di Insight 2005. L'opzione NOTHIEL è stata utilizzata per disattivare la tecnica Thiel's FSTMIN nella pratica BFGS, così la completa minimizzazione del gradiente può essere raggiunta. Il valore di GNORM è stato fissato a 0.5. Per ottenere una completa ottimizzazione della geometria di partenza abbiamo aumentato i criteri per la terminazione di tutte le ottimizzazioni di un fattore di 100, usando la *keyword* PRECISE. Lo stesso tipo di procedura è stato applicato anche per la ThT, sui due possibili conformeri ottenuti (rotazione di 180° dell'anello benzotiazolico rispetto a quello benzaminico).

Infine, sui due cristalli polimorfi del composto **NF757** è stata valutata direttamente la distribuzione elettronica applicando il metodo semiempirico AM1\_1SCF.

### ***2.3b Analisi bioinformatica***

Le strutture cristallografiche di A $\beta$  in forma fibrillare e della SOD I sono state prelevate dalla Protein Data Bank (PDB, <http://www.rcsb.org/pdb/>; codici PDB: 2BEG e 1CB4, 1E9P, 1HL4, 1HL5, 1KMG, 1PU0, rispettivamente); mentre le corrispondenti sequenze amminoacidiche sono state scaricate dalla database SwissProt/TrEMBL. Gli atomi di idrogeno sono stati aggiunti a tutte le strutture della PDB considerando un valore di pH di 7.2.

L'analisi delle strutture cristallografiche è stata effettuata attraverso l'utilizzo dei moduli Biopolymer e Homology di Insight2005.

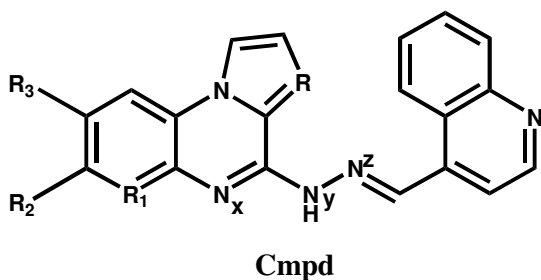
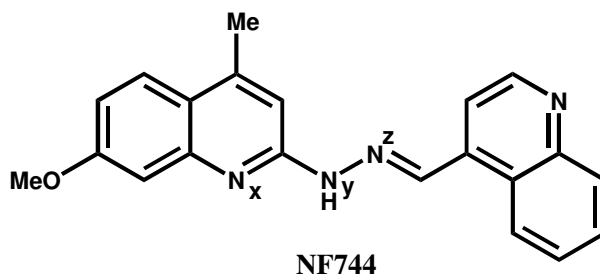
Dal momento che A $\beta$  lega gli ioni metallici, in particolare il Cu\*, formando con esso un sito di coordinazione simile a quello per Cu\* e Zn\* presente nella SOD di tipo I, una prima analisi topologica è stata effettuata proprio a partire dalla SOD I. In particolare, poiché le fibrille di A $\beta$  in 2BEG mancano della porzione 1-16 (che non sembra strutturarsi a  $\beta$ -sheet) ove sono presenti i residui che sono stati indicati legare i metalli (His6, His13, His14 ed Tyr10), il nostro studio è partito dall'analisi del sito attivo della SOD I al fine di identificare il possibile "farmacoforo" rectoriale che poteva essere riprodotto nelle fibrille di A $\beta$ .

## 2.4 RISULTATI E DISCUSSIONE

I composti progettati sono stati sviluppati grazie alla collaborazione scientifica esistente fra il gruppo di ricerca presso cui ho svolto il mio lavoro di ricerca, l'Università di Siena (Prof. Campiani) e l'industria farmaceutica Sigma-Tau, e sono attualmente oggetto di brevetto mondiale WO0224652A1.

Uno schema generale della struttura dei nuovi composti sviluppati è riportata nello schema 1 di seguito illustrato.

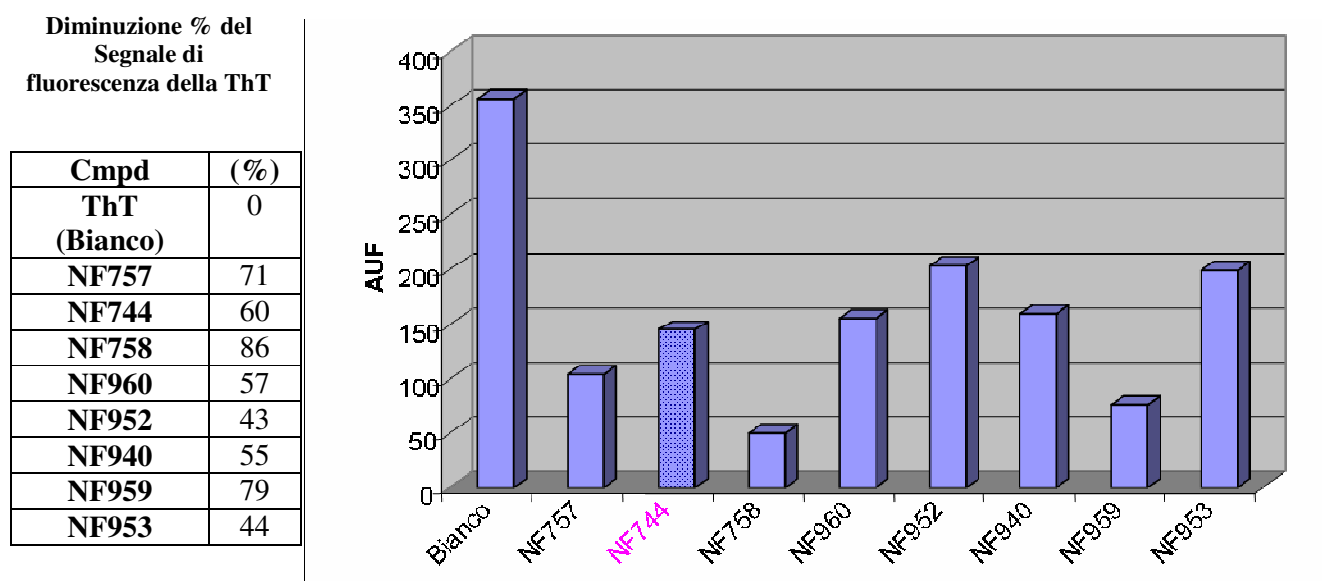
**Schema 1.** Schema generale dei composti sviluppati.



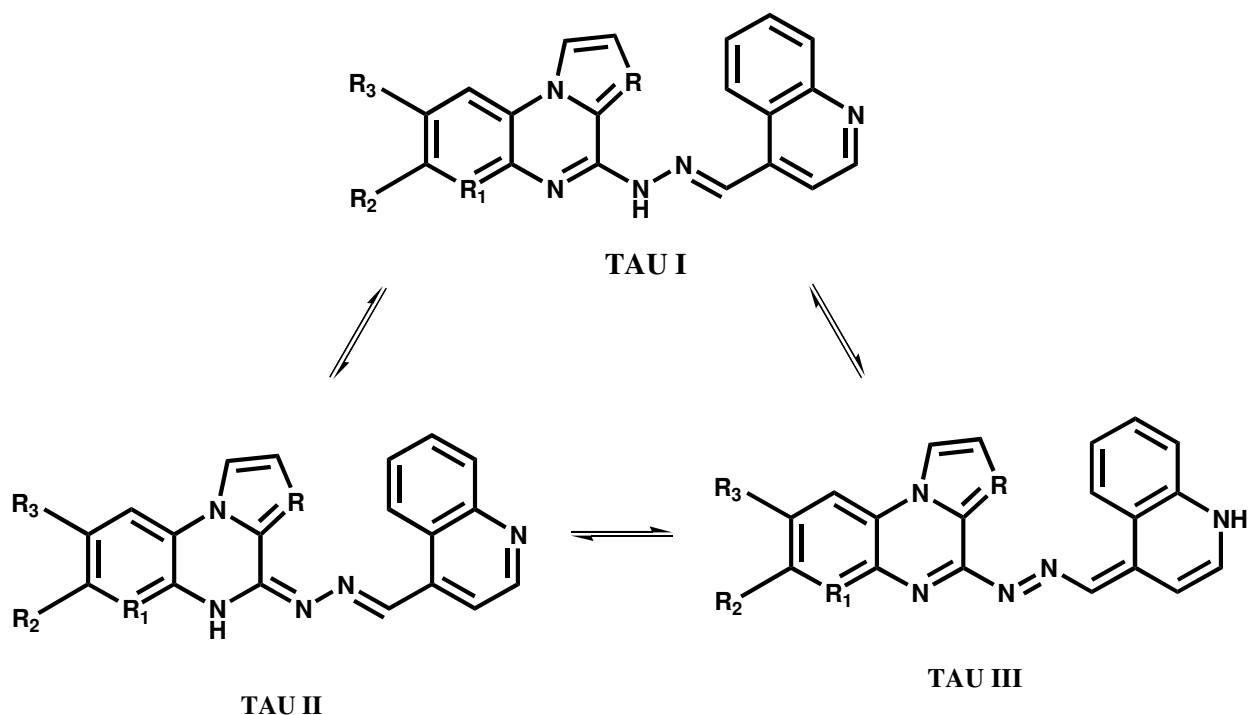
Cmpd	R	R1	R2	R3
NF757	CH	CH	OMe	H
NF758	CH	CH	H	H
NF960	N	CH	F	H
NF952	N	CH	H	H
NF940	CH	CH	Me	Me
NF959	CH	CH	F	H
NF953	CH	N	H	H

L'affinità di *binding* dei nuovi composti alle fibrille di A $\beta$  1-42 è stata misurata in vitro in termini di diminuzione del segnale di fluorescenza della ThT (Grafico 1). In particolare, i composti sviluppati sono stati incubati in presenza di fibrille preformate di A $\beta$  1-42 per trenta minuti e, successivamente, è stato effettuato il test di binding della ThT alle fibrille. Come riportato nel grafico 1, i composti determinano una diminuzione della fluorescenza della ThT che varia dal 87% (NF758) al 43% (NF952).

**Grafico 1.** Affinità di binding dei composti sviluppati alle fibrille di A $\beta$  1-42.



Come precedentemente riportato, al fine di implementare la fluorescenza e l'interazione specifica con le fibrille di A $\beta$ , nei nuovi composti sviluppati è stata introdotta la possibilità di avere diverse forme tautomeriche (Schema 2).



**Schema 2.** Possibili forme tautomeriche dei nuovi composti progettati.

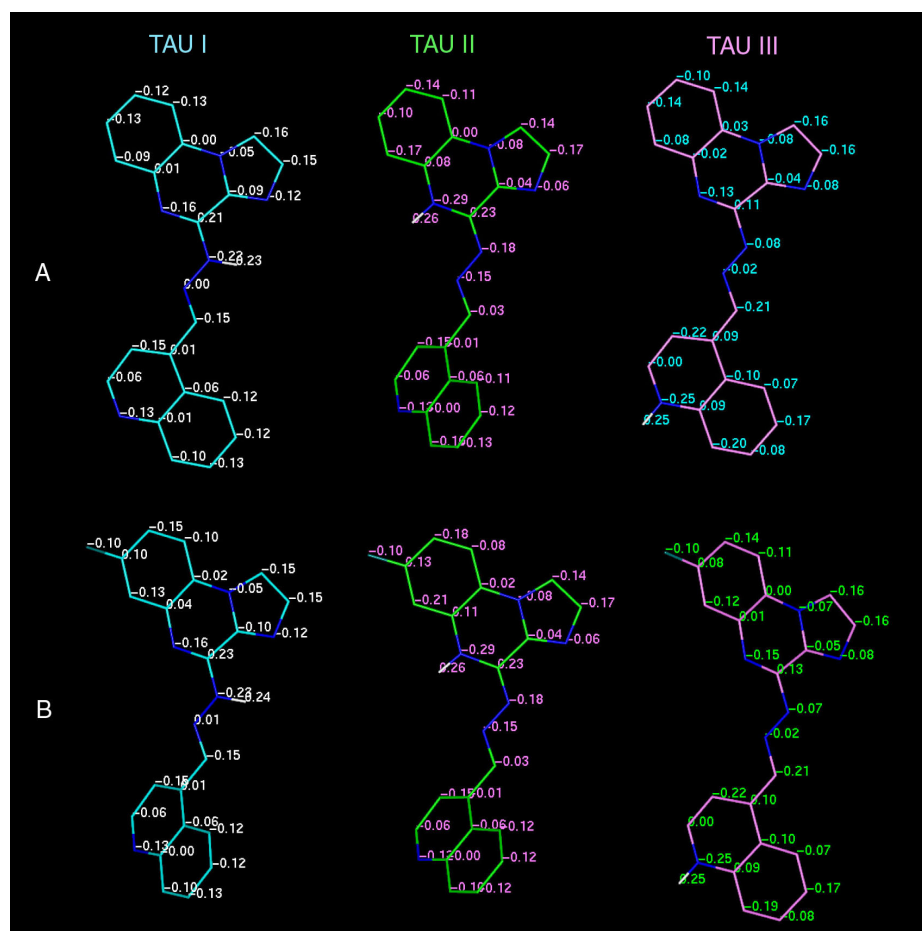
Come è possibile notare dallo Schema 2, nel tautomero II, sebbene vi sia una parziale “dearomatizzazione” dell’anello centrale del nucleo pirrolochinossalinico, certamente si verifica (attraverso la sua estensione al linker idrazonico) una maggiore coniugazione dei due sistemi aromatici. Parimenti alla ThT, questa più elevata coniugazione conferisce alla molecola una maggiore co-planarità dei due anelli aromatici, che ne favorisce l’intercalazione tra le fibrille di A $\beta$ , e quindi l’affinità per esse, e lo scambio più facile tra le possibili forme tautomeriche del composto e, conseguentemente, una maggiore fluorescenza. Il Tautomero II, inoltre, è ulteriormente stabilizzato dalla possibilità di avere un legame idrogeno intramolecolare tra l’idrogeno tautomerico e l’atomo di azoto del linker idrazonico

indicato come Nz nello Schema 1. E' importante sottolineare che il nucleo a cinque termini che così si viene a formare è stato già precedentemente indicato legare metalli di transizione come Cu\* e Zn\* (codice CSD: JAPBUY).<sup>33</sup>

Coerentemente con quanto illustrato, i risultati ottenuti dall'analisi conformazionale ed elettronica dei composti sviluppati, nelle tre forme tautomeriche possibili, mostrano una stretta correlazione tra la possibilità di stabilizzare il Tautomero II e l'affinità di *binding* alle fibrille di Aβ. Va tuttavia evidenziato che oltre ai fattori elettronici, dalle relazioni struttura-attività (SAR), emerge che anche fattori sterici possono influire significativamente sull'affinità di *binding* alle fibrille.

Il composto **NF758**, privo di sostituenti sull'anello pirrolochinossalinico, risulta essere il più attivo della serie, determinando uno spiazzamento dell'86% della ThT legata alle fibrille. In Figura 1 sono mostrati i conformeri energeticamente più stabili ottenuti dal calcolo semiempirico di tipo AM1 eseguito su i minimi provenienti dalla ricerca conformazionale per questo composto, nelle forme tautomeriche I, II e III e le rispettive cariche parziali. Come è possibile notare in Figura 1, il Tautomero II del composto **NF758** possiede una più forte densità di carica negativa sull'atomo di azoto Nz (Schema 1) rispetto al Tautomero I e III, il che corrisponde ad una maggiore tendenza e forza ad accettare/condividere il protone (quando presente su Nx, Schema 1) e, secondo la classificazione di Pearson, ad una maggiore tendenza alla chelazione di metalli di transizione che si comportano come acidi di Lewis di “media” forza, quali il Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>.<sup>34</sup>





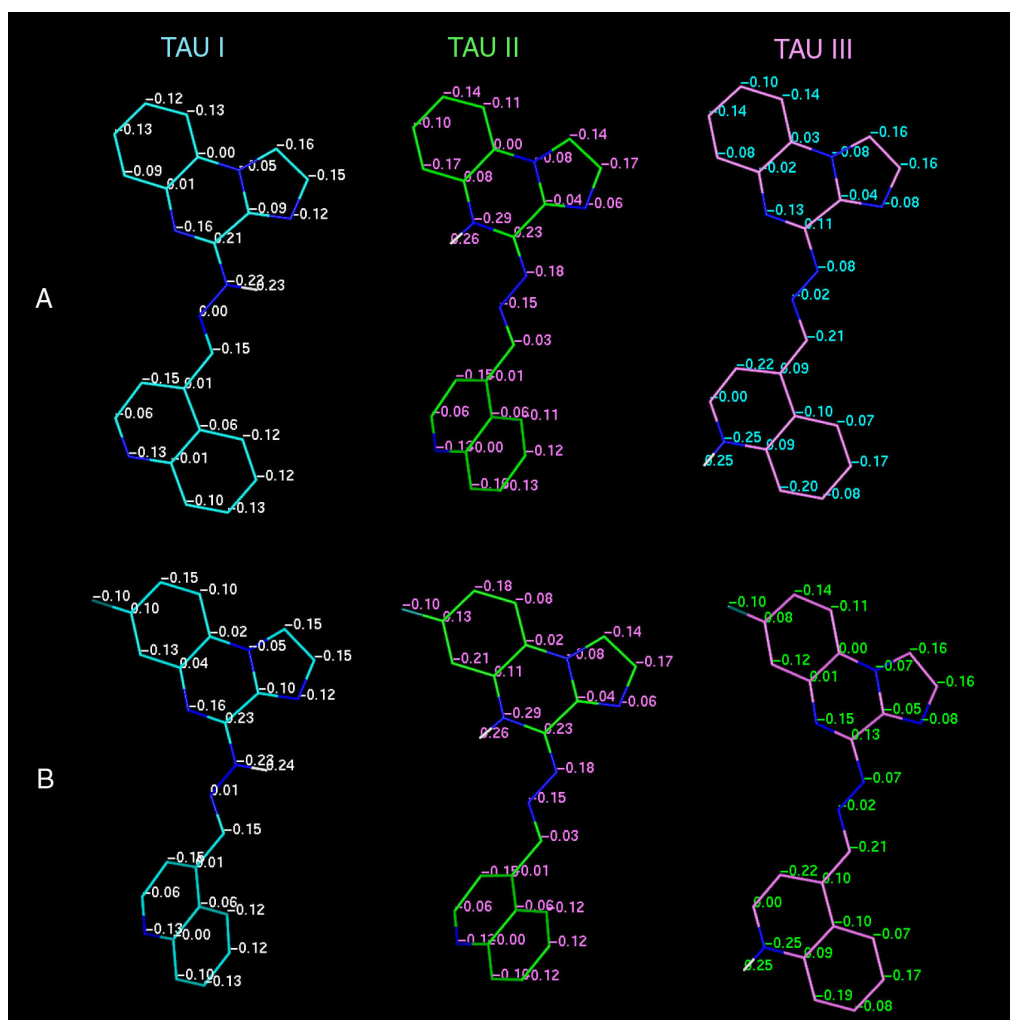
**Figura 1.** Distribuzione delle cariche parziali de composti A) NF758 e B) NF959 nelle forme tautomeriche I (ciano), II (verde) e III (rosa).

Quando, tuttavia, l'atomo di idrogeno in posizione R2 viene sostituito da un atomo di fluoro (**NF959**), la capacità di spiazzamento della ThT dalle fibrille amiloidee passa dal 86% al 79%. La diminuzione dell'affinità di binding è da ascriversi all'effetto elettronattrattore esercitato dal F sull'anello benzenico del nucleo pirrolochinossalinico che va ad inficiare sulla stabilità del Tautomero II. Se infatti si osserva la distribuzione delle cariche parziali sulle tre forme tautomeriche del composto **NF959** rispetto al composto **NF758** (Figura 1 B vs A), è possibile notare come la presenza del F depauperi di elettroni di azoto indicato come Nx nello

Schema 1 (e quindi ne diminuisca la tendenza ad accettare il protone), aumentando la densità di carica nelle posizioni orto e para dell'anello benzenico del nucleo pirrolochinossalinico.

L'introduzione di un atomo di azoto in posizione R nei composti **NF959** e **NF758** per formare rispettivamente i composti **NF960** ed **NF952**, determina una significativa diminuzione dell'affinità di binding per le fibrille di A $\beta$ . In questi composti, infatti, la presenza di un ulteriore atomo di azoto sull'anello a 5 termini del sistema pirrolochinossalinico (R, Schema 1), permette la formazione di un legame idrogeno alternativo tra l'azoto aromatico introdotto in posizione R e l'idrogeno legato all'atomo di azoto Ny (Schema 1), presente solo nel Tautomero I (Schema 2), stabilizzando così questa forma tautomerica, e, conseguentemente, influenzandone l'equilibrio con le altre. La distribuzione delle cariche parziali (Figura 2), inoltre, mostra una particolare densità di carica negativa sull'azoto in R nel Tautomero I rispetto alle altre forme tautomeriche, confermando l'alta tendenza di questo atomo a condividere il legame idrogeno con l'atomo di azoto Ny del linker idrazonico (Schema 1).

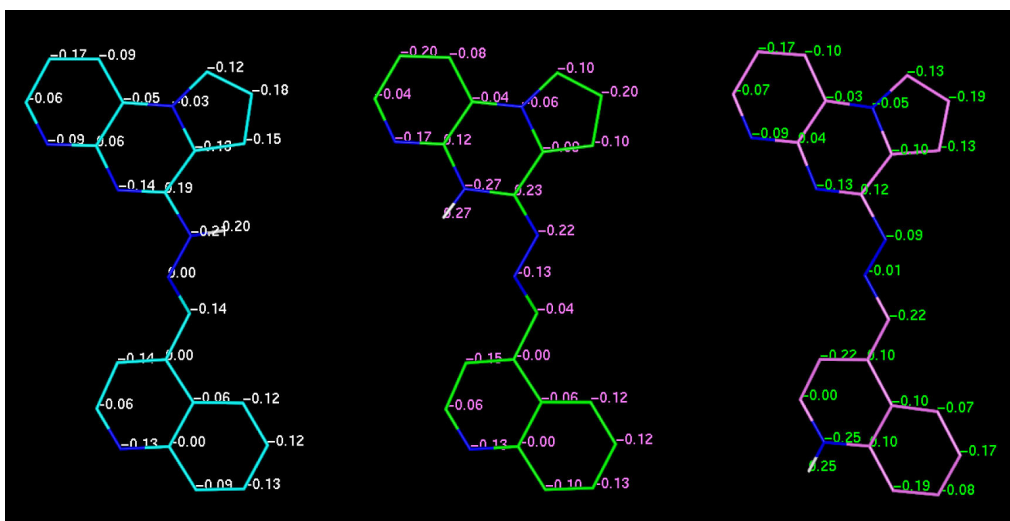
Va tuttavia evidenziato che mentre nei composti a nucleo pirrolochinossalinico l'introduzione del sostituito F determina un calo dell'affinità di *binding* alle fibrille di A $\beta$ , nei composti imidazochinossalinici questa tendenza si inverte, in quanto il composto **NF960** ha una maggiore affinità alle fibrille rispetto al composto **NF952**.



**Figura 2.** Distribuzione delle cariche parziali de composti A) NF952 e B) NF960 nelle forme tautomeriche I (ciano), II (verde) e III (rosa).

Dall'analisi delle distribuzioni di carica parziale emerge che nel composto **NF960** il F esercita un effetto destabilizzante sulla coniugazione tra gli anelli aromatici. Il suo effetto elettronattrattore, infatti, aumenta la densità di carica negativa nelle posizioni in orto e para rispetto ad esso, opponendosi in questo modo all'estensione della coniugazione attraverso il linker idrazonico e alterando, quindi, gli equilibri tra le varie forme tautomeriche

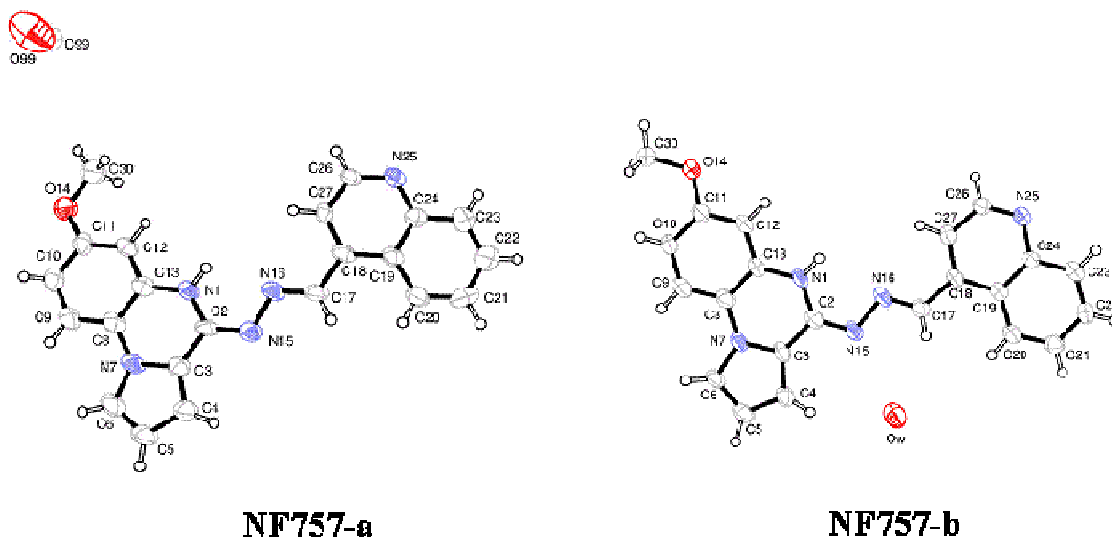
Un'influenza sugli equilibri tautomerici si verifica anche quando viene introdotto un atomo di N in posizione R1 (**NF953**). Come illustrato in Figura 3, la presenza di un ulteriore atomo di azoto determina una diminuzione della densità di carica negativa sull'atomo Nx (Schema 1), rendendo meno probabile la formazione del Tautomero II.



**Figura 3.** Distribuzione delle cariche parziali del composto NF953 nelle forme tautomeriche I (ciano), II (verde) e III (rosa).

Come precedentemente riportato, oltre a fattori elettronici anche fattori sterici possono influire sull'affinità di binding alle fibrille di A $\beta$ . Quando, infatti, sul nucleo pirrolochinossalinico viene introdotto un gruppo metossi (**NF757**) in posizione R3, si verifica una riduzione dell'affinità di binding, sebbene comunque tale gruppo eserciti un effetto stabilizzante, elettrone-donatore, sul Tautomero II. Gli studi di cristallografia a raggi X hanno infatti dimostrato che il composto **NF757** cristallizza, a seconda del solvente utilizzato, in due strutture polimorfiche (**NF757-a** e **NF757-b**,

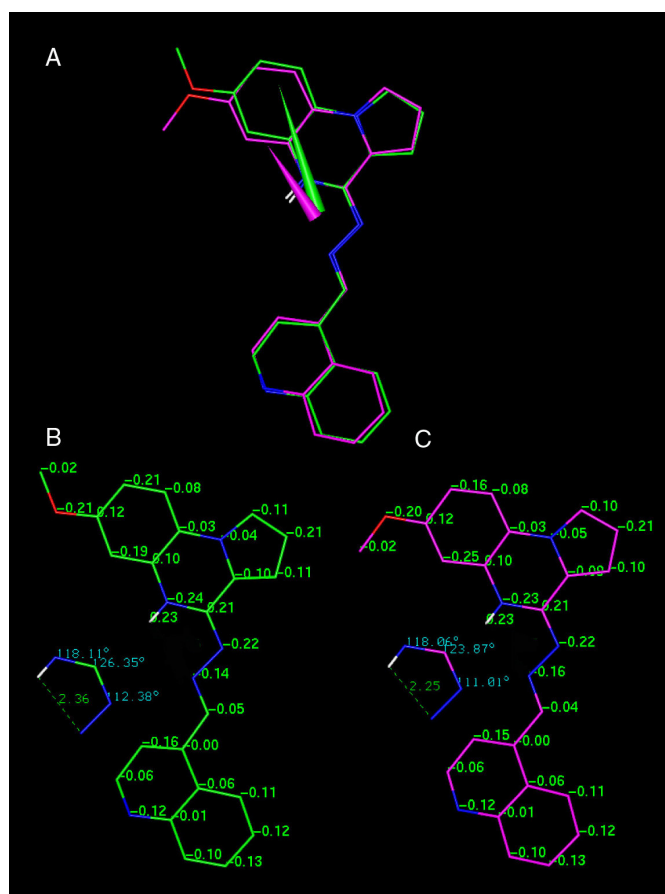
Figura 4), diverse tra loro solo per l'orientazione del gruppo metossilico, entrambe corrispondenti al Tautomero II come previsto dall'analisi conformazionale. Esse, infatti, presentano: i) un singolo legame tra i due azoti del linker idrazonico (N15 ed N16, Figura 4); ii) un doppio legame tra uno di essi (N15, Figura 4) e l'anello chinossalinico; iii) la presenza di un legame idrogeno intramolecolare N(1)-H $\cdots$ N(16) con una distanza H $\cdots$ N pari rispettivamente a 2.36 e 2.24 Å per **NF757-a** e **NF757-b**. I raggi x hanno inoltre confermato la coplanarità dei due sistemi aromatici, con valori degli angoli diedri formati dall'anello pirrolochinossalinico e di quello chinolinico rispettivamente di 10.58(1) e 12.65(11)° per **NF757-a** and **NF757-b**.



**Figura 4.** Struttura atomica delle due strutture polimorfe del composto NF757 determinate tramite analisi cristallografica.

Inoltre, dalla cristallografia a raggi X emerge che le molecole di **NF757** sono altamente impacchettate tra loro presentando, a seconda del solvente di cristallizzazione, il gruppo metossi nelle due possibili orientazioni (Figura 4). La diversa orientazione di questo gruppo, tuttavia, influisce sull'orientazione del

momenti dipolari delle due strutture polimorfiche di **NF757**, ottenuti previo calcolo della distribuzione elettronica nella loro conformazione (calcolo semiempirico di tipo AM1\_1SCF), che presentano un'orientazione diversa, pur mantenendo entrambi una forte densità di carica negativa sul linker idrazonico (Figura 5, A). Questa diversa orientazione del vettore dipolare, risulta in una maggiore attrazione tra N16 del linker idrazonico ed N1-H in **NF757-a**, come è dimostrato dalle variazioni: i) delle cariche parziali, ii) delle distanze, e iii) degli angoli di legame, illustrate in Figura 5 B,C.



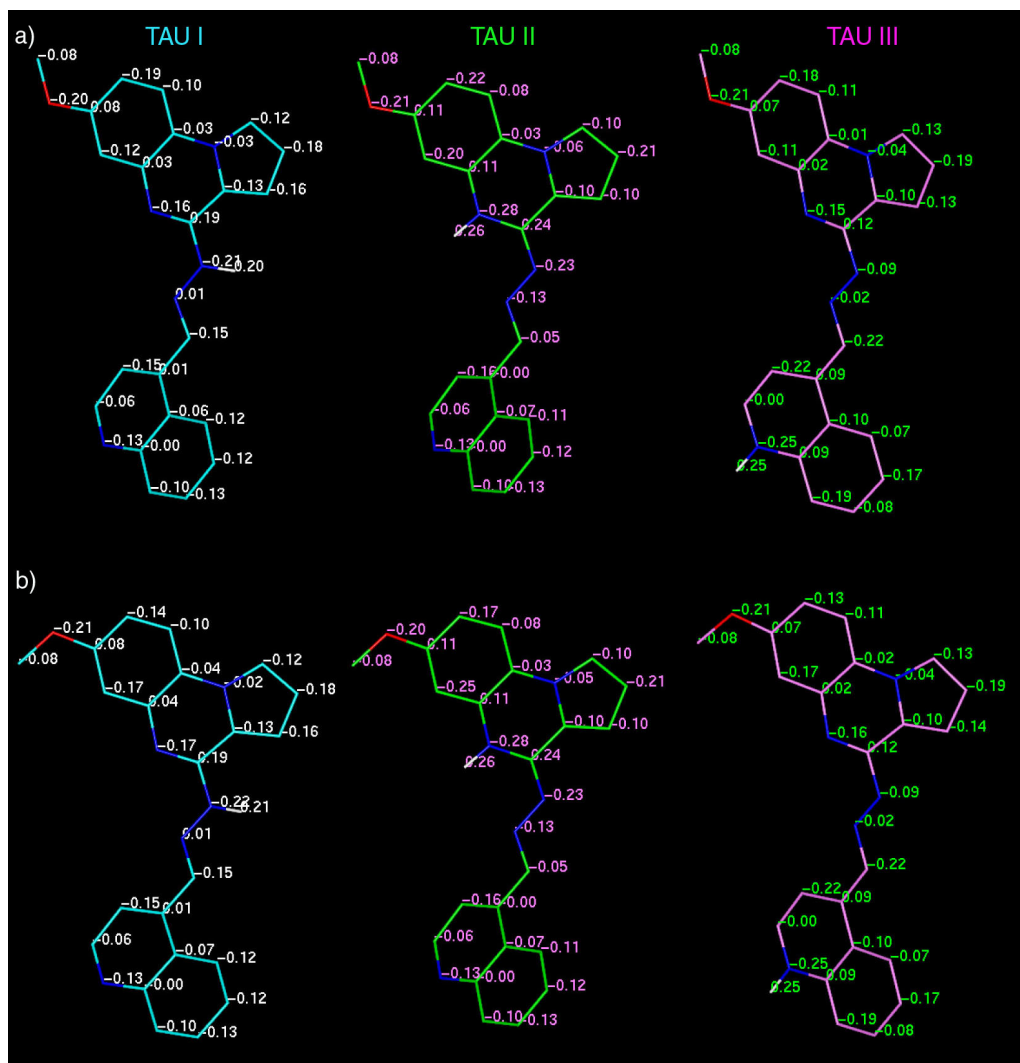
**Figura 5.** A) Dipoli totali dei polimorfi **NF757-a** (verde) e **NF757-b** (magenta). B) Distribuzione delle cariche parziali in **NF757-a**, a sinistra: angoli di legame del linker H-N1-N16 e distanza N1-H $\cdots$ N16. C) Distribuzione delle cariche parziali in **NF757-b**, a sinistra: angoli di legame del linker H-N1-N16 e distanza N1-H $\cdots$ N16.

E' interessante notare che in **NF757-a** la maggiore attrazione tra il linker idrazonico e l'atomo di azoto N16 (Figura 4) determina l'orientamento del vettore dipolare esattamente nella direzione del legame idrogeno tra N1-H ed N16, che è responsabile della forte stabilità del Tautomero II stesso. Questi dati, comunque, confermano l'alta tendenza della molecola a preferire una conformazione planare, corrispondente al Tautomero II, che certamente è indicativa della capacità di intercalarsi tra le fibrille di A $\beta$ . D'altro canto però, la presenza di un sostituito ingombrante sull'anello pirrolochinossalinico e la sua possibile rotazione, influiscono negativamente sulla capacità di intercalarsi tra le fibrille, e quindi determinano una minore fluorescenza, sebbene, come verrà in seguito discusso, introducono nei composti sviluppati capacità anti-aggreganti sulle fibrille.

La ricerca conformazionale eseguita sui tre possibili tautomeri di **NF757** e il successivo calcolo semiempirico di tipo AM1 eseguito sui minimi da essa ottenuti mostrano dati coerenti con quanto emerso dalla cristallografia ai raggi X. In Figura 6 sono mostrati i conformeri energeticamente più stabili ottenuti dal calcolo semiempirico di tipo AM1 per **NF757**, considerando le due possibili orientazioni del gruppo metossi, nelle forme tautomeriche I, II e III e le rispettive cariche parziali.

Analogamente a quanto emerso dalla cristallografia a raggi X, infatti, i nostri calcoli indicano come la maggiore stabilità del Tautomero II, il quale presenta la più alta coniugazione tra l'anello pirrolochinossalinico e quello chinolinico e una forte densità di carica negativa sul linker idrazonico, in particolare sull'atomo di azoto

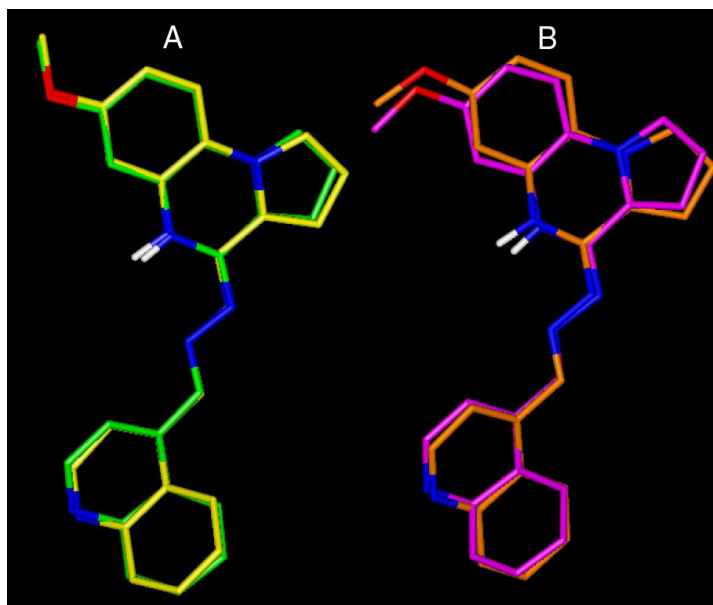
indicato come Nz nello Schema 1, confermando la maggiore tendenza e forza ad accettare/condividere il protone presente su Nx (Schema 1).



**Figura 6.** Distribuzione delle cariche parziali dei tautomeri I (ciano), II (Verde) e III (rosa) nelle due possibili orientazioni del gruppo metossile.

E' interessante notare che i conformeri corrispondenti alle strutture polimorfiche **NF757-a** ed **NF757-b** corrispondono al minimo globale della ricerca conformazionale e al conformero a 0,16 Kcal da esso, con un valore della derivata quadratica media (RMS), ottenuto per sovrapposizione degli atomi di carbonio dei due conformeri sulle X-ray, rispettivamente di 0.31 Å e 0.50 Å (Figura 7).



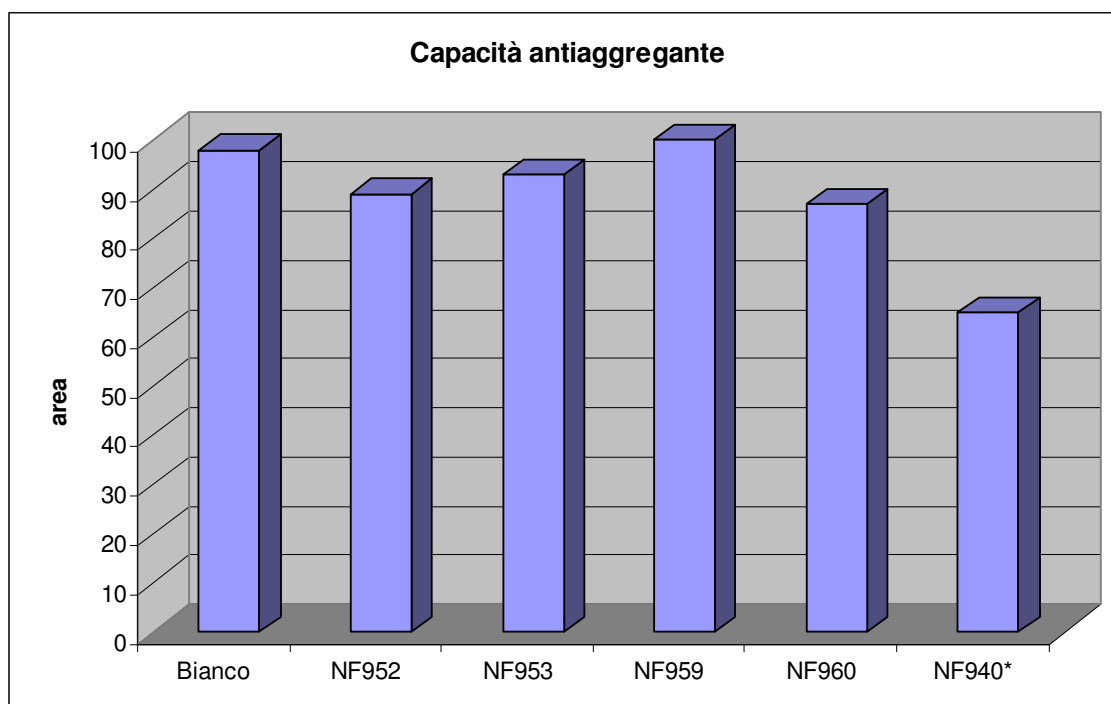


**Figura 7.** Sovrapposizione dei minimi ottenuti dalla ricerca conformazionale alle strutture polimorfiche **NF757-a** e **NF757-b**: (A) Conformer a 0,16 Kcal dal minimo globale (atomi di carbonio in giallo) sovrapposto a **NF757-a** (atomi di carbonio verdi); (B) Minimo globale (atomi di carbonio in arancio) sovrapposto a **NF757-b** (atomi di carbonio in Magenta).

Anche il legame idrogeno osservato nelle strutture cristallografiche tra gli azoti N1 ed N16 (Figura 4), indicati nello Schema 1 come  $N_x$  e  $N_z$ , viene confermato nei due conformeri di minimo con una distanza tra di essi pari a 2.69 Å in entrambi. Come è possibile osservare in Figura 7, tuttavia, nei minimi ottenuti dalla ricerca è presente una leggera inclinazione del piano dell'anello chinolinico rispetto a quello del nucleo pirrolochinossalinico che risultano, invece, essere coplanari nelle X-ray. Questa differenza è certamente ascrivibile all'effetto di "impacchettamento" dei polimorfi **NF757-a** ed **NF757-b** nelle condizioni di cristallizzazione e va considerata indicativa della capacità della molecola (parimenti alla tioflavina T) di assumere questa conformazione in seguito all'interazione con un ambiente più idrofobico ed ingombrante, quale quello delle placche amiloidee, e, aumentando la coniugazione tra i due anelli aromatici, di aumentare il suo rendimento di fluorescenza.

Come già osservato per il composto **NF757**, tuttavia, agli effetti elettronici esercitati dal sostituente sul nucleo pirrolochinossalinico vanno aggiunti gli effetti sterici che sostituenti particolarmente ingombranti in posizione R1 e R2 possono avere sull'affinità di *binding* per le fibrille di A $\beta$ 1-42. Se, infatti, la presenza di un ingombro sterico può determinare un calo nella capacità di spiazzare la tioflavina T dalle fibrille, esso può anche influire sulla capacità del composto di: i) legarsi a fibrille di A $\beta$  variamente impacchettate e quindi in diverse forme di aggregazione e ii) impedire l'ulteriore aggregazione di altri monomeri di A $\beta$  in seguito alla variazione conformazionale che essi inducono per consentire la loro accomodazione nel sito di legame sulle fibrille. A conferma di ciò, va sottolineato che l'influenza degli effetti sterici sul legame alle fibrille amiloidee è stata osservata anche sui diversi derivati della stessa ThT. Infatti, Lockart e i suoi collaboratori<sup>32</sup> hanno dimostrato che esistono diversi siti di interazione dei marcatori di *imaging* sulle placche amiloidee (corrispondenti a diversi stati di aggregazione delle stesse) e che sostituenti introdotti sull'anello benzotiazolico della ThT possono variarne significativamente l'affinità. In particolare quando sull'anello benzotiazolico viene introdotto un alogeno ingombrante come lo iodio, la I-ThT perde affinità per il sito corrispondente alla maggiore aggregazione delle fibrille amiloidee (300 monomeri, vedere paragrafo 2.2) divenendo più affine per quello a minore aggregazione. Questo effetto può essere spiegato proprio alla luce del fatto che un sostituente ingombrante ostacola l'accomodazione della ThT nelle fibrille a maggiore stato di aggregazione perché sono chiaramente più impacchettate. In accordo con queste osservazioni, il

composto **NF940**, in cui in posizione R2 e R3 sono stati introdotti due gruppi metilici, presenta una più bassa capacità di spiazzare la ThT, ma una più alta capacità anti-aggregante tra i composti sviluppati (Figura 8).



**Figura 8.** Risultati ottenuti sulla capacità di ridurre l'aggregazione di A $\beta$  in soluzione da parte dei nuovi composti sviluppati (effettuati presso l'industria farmaceutica Sigma-Tau).

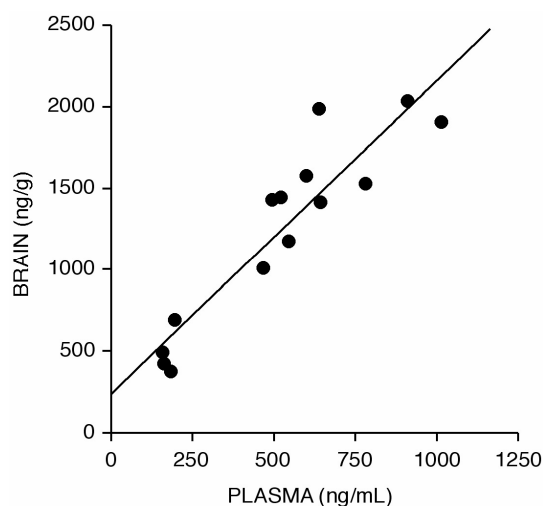
In particolare, la capacità antiaggregante dei composti sviluppati è stata valutata per determinazione diretta mediante HPLC del peptide A $\beta$  1-42 nel pellet, dopo 5 giorni di incubazione con i composti (a 37° C) e centrifugazione della soluzione del peptide.

E' interessante notare come la capacità antiaggregante sia inversamente proporzionale all'affinità di *binding* alle fibrille di A $\beta$  (Grafico 1) e quindi alla capacità delle molecole di formare il tautomero II. Oltre al composto **NF940** infatti

questa proprietà è posseduta anche dai composti per cui è stata precedentemente dimostrata la minore tendenza a formare il tautomero II, quali i composti **NF952**, **NF953** ed **NF960**. Come precedentemente illustrato, la coplanarità dei due nuclei aromatici, fondamentale per l'intercalazione tra le fibrille di A $\beta$ , è strettamente correlata all'estensione della coniugazione al linker idrazonico, condizione che si verifica soprattutto nel Tautomero II. Nel Tautomero I, infatti, l'interruzione della coniugazione sul linker idrazonico, determina la rotazione dei due nuclei aromatici l'uno rispetto all'altro e questo, sebbene influisca sulla capacità intercalante, certamente determina un effetto antiaggregante dovuto al riarrangiamento che la molecola induce tra le fibrille per potersi accomodare.

Infine, dal momento che il principale limite dell'uso della ThT, quale diagnostico dell'AD in vivo, è la sua incapacità di attraversare la BBB, sui composti sviluppati è stata valutata anche la capacità di penetrare nel SNC (test effettuati presso i Laboratori di Ricerca Sigma-Tau). I saggi effettuati dimostrano che i composti sviluppati superano velocemente la BBB, distribuendosi tra plasma e cervello in maniera ottimale. In particolare, il composto **NF959**, in relazione alla dose e al tempo di campionamento, si concentra nel SNC in maniera 3 volte superiore rispetto al plasma. Come mostrato in Figura 9, esiste una relazione lineare tra le concentrazioni di plasma e cervello determinate 30 min dopo la somministrazione. Questa relazione lineare suggerisce che la ratio tra le concentrazioni plasmatiche e cerebrali del composto **NF959** è indipendente dalle concentrazioni plasmatiche e che

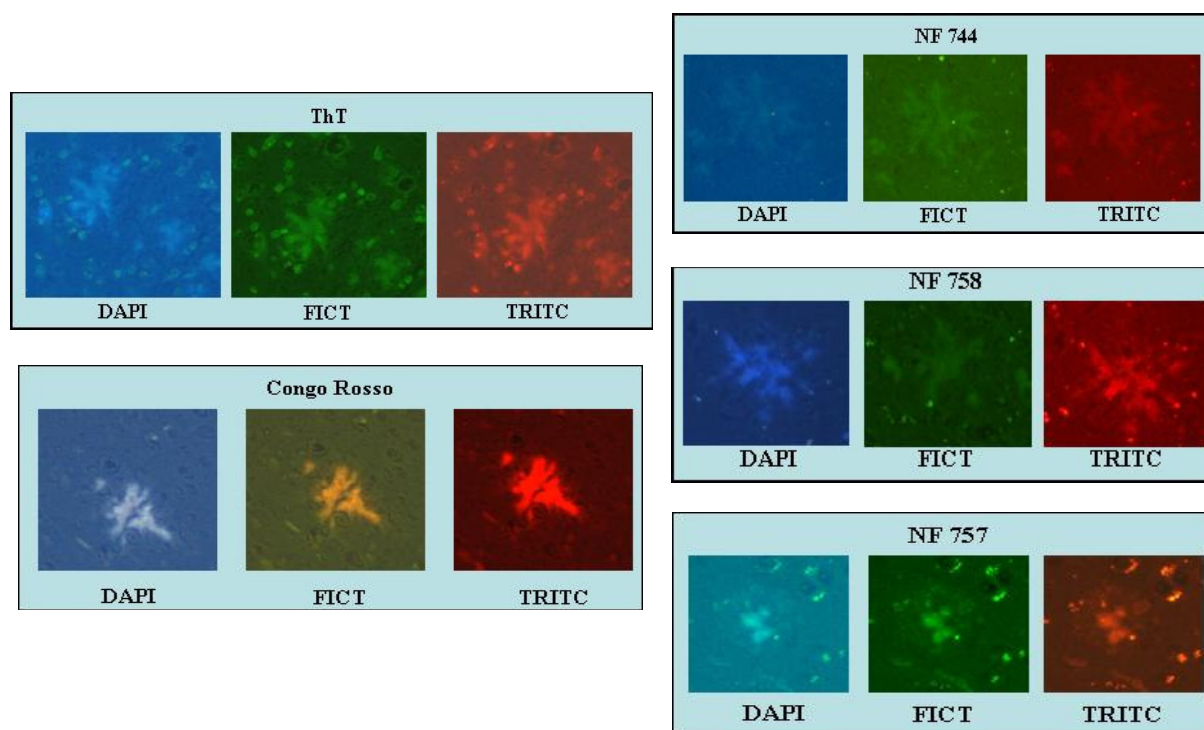
il composto **NF959** attraversa la BBB per diffusione passiva, senza l'ausilio di carrier saturabili che potrebbero limitarne il trasporto attraverso la BBB.



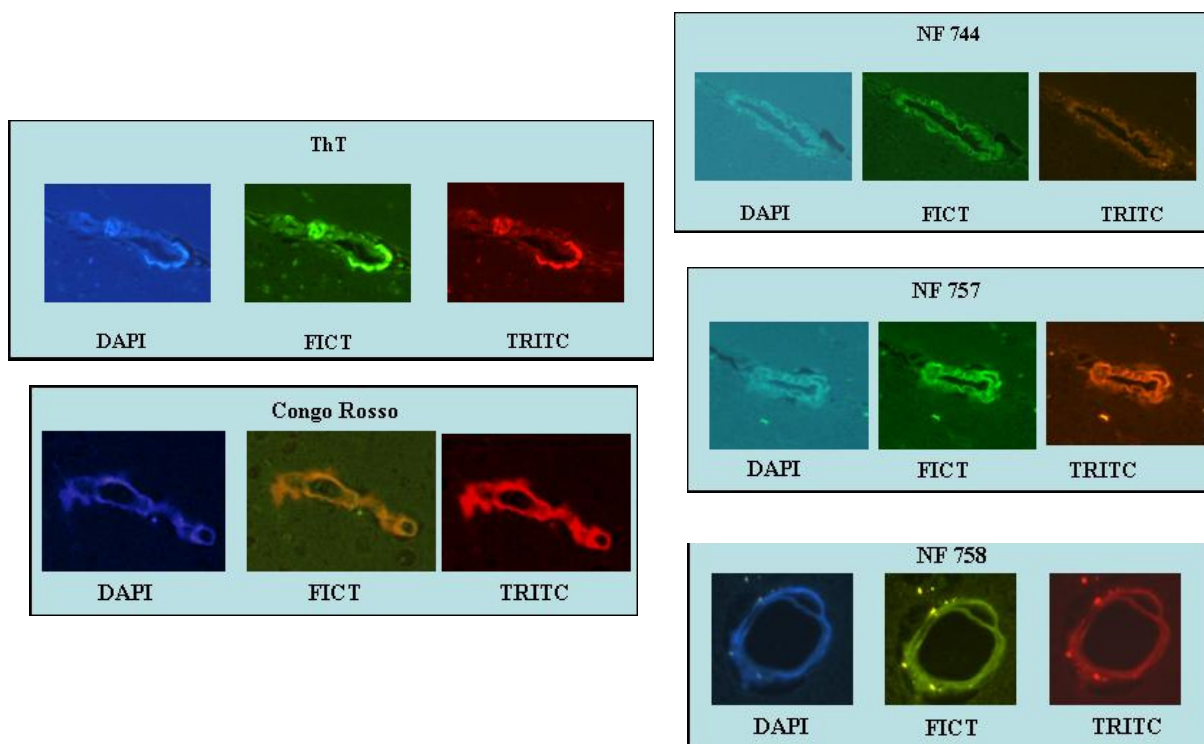
**Figura 9.** Grafico della distribuzione plasma-cervello relativo al composto NF959 (studi effettuati presso l'industria farmaceutica Sigma-Tau).

Alla luce dei risultati ottenuti è possibile affermare che i nuovi composti sviluppati durante il mio lavoro di dottorato si sono dimostrati in grado di diminuire la fluorescenza della ThT interagendo con le fibrille di A $\beta$ , probabilmente selezionandone particolari stati di aggregazione. Recenti test condotti su fettine di cervello di topi transgenici CRND 8, che, presentando la doppia mutazione per l'APP umano, accumulano depositi di A $\beta$  nel parenchima cerebrale e a livello cerebrovascolare, hanno dimostrato che i composti sviluppati possiedono proprietà fluorescenti intrinseche. In particolare, l'esame con fluoromicroscopio (mediante l'utilizzo di filtri UV, FITC e TRITC) eseguito sulle fettine di cervello dei topi CRND8 ha mostrato che i composti sviluppati, con l'eccezione di **NF744**, legano i

foglietti  $\beta$  delle fibrille amiloidee emettendo fluorescenza in maniera simile al Congo red e alla ThT (Figura 10 e Figura 11).



**Figura 10.** Fluorescenza emessa dai composti **NF744**, **NF758** ed **NF757** e da ThT e congo Red nei depositi amiloidei presenti nel parenchima cerebrale dei topi transgenici CRND8.



**Figura 10.** Fluorescenza emessa dai composti **NF744**, **NF758** ed **NF757** e da ThT e congo Red nei depositi amiloidei cerebrovascolari presenti nei topi transgenici CRND8.

E' chiaro che tali risultati rendono sempre più valido e interessante l'utilizzo di questi composti quali agenti diagnostici dell'AD.

Resta, tuttavia, da chiarire con quale meccanismo essi siano in grado di esplicare questi effetti.

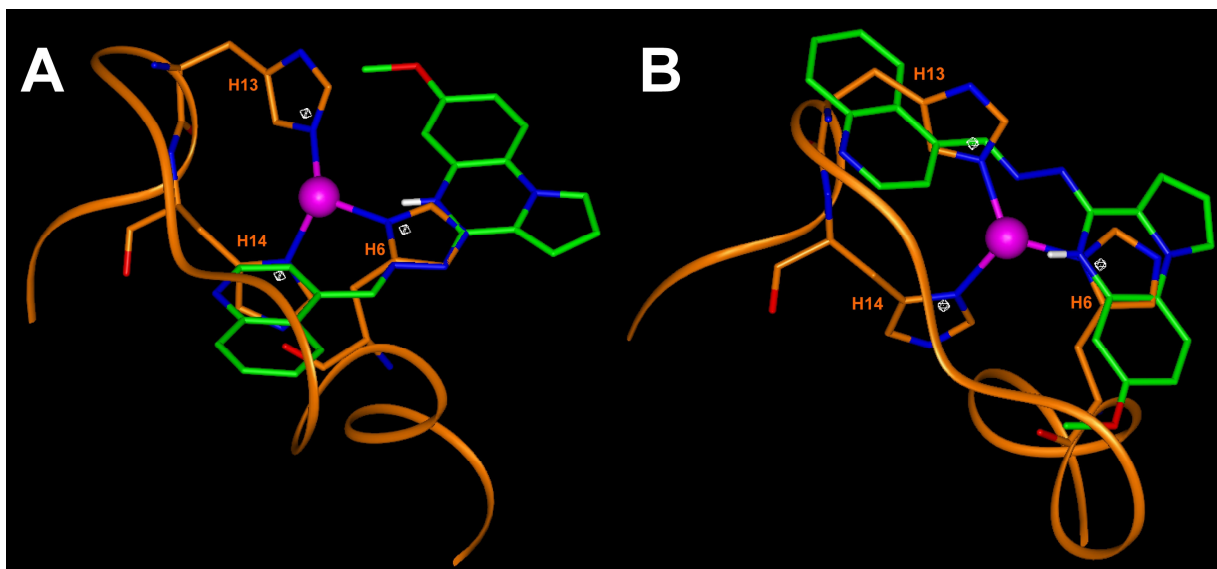
Tenendo conto delle capacità chelanti dei nuovi composti, è possibile formulare diverse ipotesi sulla natura della loro interazione con le fibrille di A $\beta$  e sul meccanismo che può sottendere alla diminuzione della fluorescenza della ThT. Queste ipotesi tengono conto della natura del sito di coordinazione degli ioni metallici di A $\beta$ , della sua estrema similarità con il sito catalitico di Cu/Zn SOD ma soprattutto della sua locazione. Diverse evidenze sperimentali, infatti, indicano che la

porzione amminoacidica 1-16 di A $\beta$ , in cui sono presenti le istidine responsabili del legame con i metalli, possiede un'alta variabilità conformazionale che rende difficile stabilire la strutturazione nelle fibrille.

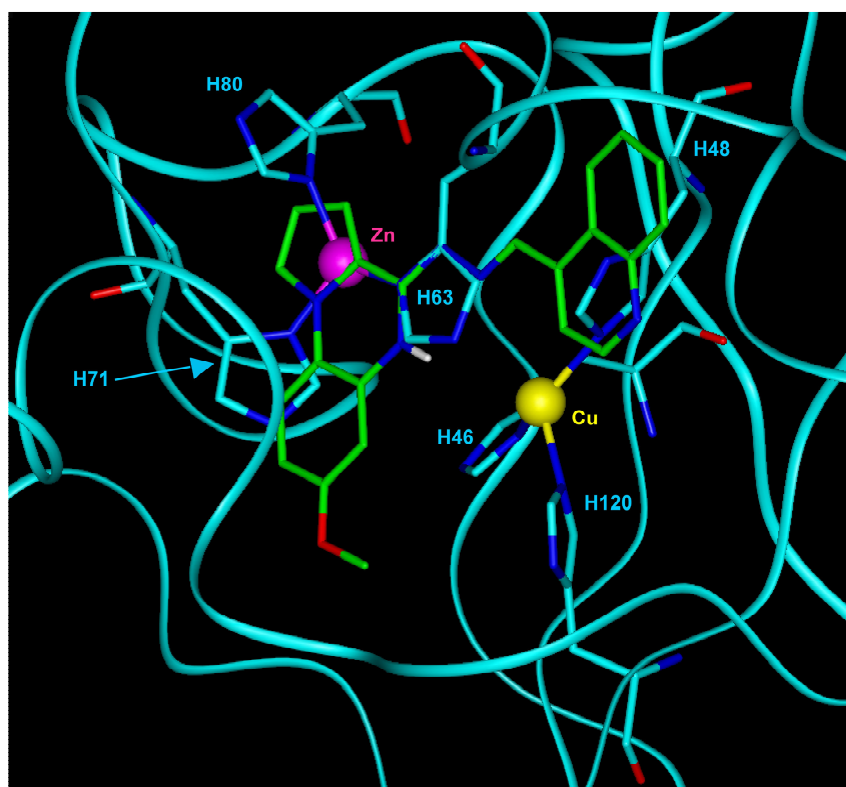
Alla luce di queste conoscenze, quindi, si possono formulare due ipotesi: la prima è che questa porzione di A $\beta$  non si strutturi mai a  $\beta$ -sheet nelle fibrille, costituendo così un sito allosterico a quello delle fibrille in cui si lega la ThT; la seconda è che essa subisca un cambiamento conformazionale che ne induce successivamente la strutturazione nel foglietto  $\beta$ . Nel primo caso, quindi, i composti sviluppati, legandosi al sito degli ioni metallici, potrebbero indurre allostericamente una diminuzione della fluorescenza della ThT, probabilmente provocando una variazione conformazionale degli stessi peptidi di A $\beta$ . Conseguentemente, il nucleo idrazinico dei nostri composti dovrebbe sostituirsi ad una o più istidine nel sito di coordinazione di A $\beta$  (Figura 10, A e B) impedendone quindi il legame al metallo e il conseguente meccanismo patologico che ne scaturisce.

È interessante notare che qualora il nucleo idrazinico andasse a sostituirsi ad un istidina che fa da ponte tra due A $\beta$  (Figura 11), impedendo così l'accrescimento delle fibrille, si potrebbe giustificare anche l'effetto antiaggregante manifestato da alcuni composti (Figura 11). E' importante sottolineare che il meccanismo di competizione allosterica è già stato indicato esistere per altri agenti diagnostici.<sup>35</sup>





**Figura 10.** Interazione di NF757 con A $\beta$  attraverso la chelazione del metallo. (A) Sostituzione di un residuo di istidina; (B) Sostituzione di due residui.



**Figura 11.** Sovrapposizione di NF757 al sito di coordinazione di SOD I: ipotesi di sostituzione all'istidina ponte.

Nel secondo caso, invece, in seguito al legame con il metallo la porzione 1-16 potrebbe subire un cambiamento conformazionale tale da strutturarsi a  $\beta$ -sheet che andando a far parte dei foglietti  $\beta$  delle fibrille creerebbe il sito per la ThT e per i nostri composti. Mentre la ThT, essendo carica positivamente, potrebbe fare le veci dello ione metallico sostituendosi ad esso, i nostri composti essendo chelanti potrebbero spiazzare la ThT proprio in seguito al legame con il metallo nel suo stesso sito, aumentandone, così, l'affinità per le fibrille amiloidee.

## 2.5 CONCLUSIONI

I limiti nel trattamento del morbo di Alzheimer (AD) riguardano soprattutto l'impossibilità di effettuare la diagnosi quando il paziente è ancora in vita e di ostacolare il processo di neurodegenerazione ascrivibile al danno chimico-fisico apportato dalle placche di A $\beta$ . Lo sviluppo, quindi, di agenti diagnostici in grado di superare la BBB e legare selettivamente le fibrille amiloidee in diversi stati di aggregazione, consentirebbe non solo di diagnosticare in vita l'AD ma anche di monitorarne la progressione e valutare l'efficacia delle terapie applicate.

Attraverso l'applicazione di tecniche di modellistica molecolare e metodi computazionali, il mio lavoro di ricerca ha condotto alla progettazione ed allo sviluppo di una nuova serie di composti in grado di assolvere a tale funzione in quanto essi hanno manifestato la capacità di: i) spiazzare la ThT dalle placche amiloidee; ii) superare la BBB, garantendo un'ottimale distribuzione plasma/SNC; iii) emettere fluorescenza *in vivo* in funzione dello stato di avanzamento dell'AD in cervelli di ratto (rilevabile attraverso tecniche non invasive di *imaging*).

Dai risultati ottenuti è emerso inoltre che alcune delle molecole progettate possiedono attività antiaggregante sulle fibrille di A $\beta$ , proprietà che sebbene sia risultata non essere compatibile con quella diagnostica, certamente introduce la possibilità di avere nuovi agenti terapeutici dell'AD in grado di dissolvere le fibrille di A $\beta$  ed impedirne l'ulteriore accrescimento.

D'altro canto però il mio lavoro di ricerca ha consentito di associare contemporaneamente all'attività diagnostica anche quella terapeutica, introducendo nei nuovi composti sviluppati la capacità di chelare i metalli. Dato, infatti, il dimostrato coinvolgimento di questi ultimi nei processi patologici che sottendono all'AD, la possibilità di avere agenti diagnostici in grado di modularne la biodisponibilità in eccesso nel SNC rappresenta un valido approccio terapeutico all'AD, già confermato dall'utilizzo di altri agenti chelanti a bassa affinità in terapia. Gli studi computazionali effettuati durante il mio lavoro di ricerca hanno contribuito alla progettazione e al chiarimento del meccanismo di azione dei nuovi composti sviluppati.

I risultati sperimentali ottenuti hanno confermato la validità dell'approccio computazionale. Infatti tali molecole possono, in linea di principio, consentire la diagnosi precoce della malattia ed il monitoraggio del suo progredire, sottraendo contemporaneamente al meccanismo patologico che sottende l'AD, uno dei suoi principali fattori neurochimici: l'alterata omeostasi dei metalli.

### **3. PROGETTAZIONE DI NUOVI E POTENTI INIBITORI DELLE COLINESTERASI**

## 3.1 INTRODUZIONE

### ***3.1a Il sistema colinergico e l'AD***

Il Morbo di Alzheimer (AD) è strettamente correlato alla degenerazione dei neuroni colinergici, e delle loro proiezioni, in particolari aree del SNC quali la neocorteccia cerebrale, l'ippocampo e l'amigdala. In queste aree del SNC la popolazione colinergica diminuisce da 500-600.000 unità a 100.000 unità. Queste terminazioni colinergiche sono componenti vitali per *il sistema reticolante attivante* che è coinvolto nei processi mnemonici e dell'attenzione. Diversi studi confermano l'esistenza di una stretta correlazione tra il deficit colinergico nelle aree cerebrali del sistema reticolante attivante e le alterazioni cognitive che si manifestano in alcune patologie neurodegenerative. Coerentemente, dati post-mortem, ottenuti da saggi effettuati su cervelli di pazienti affetti da AD, evidenziano bassi livelli dei marcatori colinergici in queste aree cerebrali e alterazioni sostanziali dei principali sistemi coinvolti nella neurotrasmissione colinergica, quali: i) riduzione dell'attività della colina acetiltransferasi (CAT), l'enzima responsabile della sintesi dell'acetilcolina (ACh) e deficit nel sistema ad alta affinità dell'uptake della colina; ii) una riduzione del rilascio dell'ACh e del suo metabolismo (attività dell'acetilcolinesterasi); iii) degenerazione dei recettori nicotinici ma non di quelli muscarinici<sup>36</sup> e iv) variazioni nei livelli di espressione delle colinesterasi.

Ad oggi, l'utilizzo di inibitori delle colinesterasi (ChEI) costituisce uno dei principali approcci terapeutici al trattamento dell'AD non solo alla luce del deficit

colinergico che si manifesta in questa patologia ma anche, e soprattutto, alla luce delle sempre più numerose evidenze sperimentali che identificano in questi due enzimi un ruolo cruciale nell'insorgere e nel progredire dell'AD.

### ***3.1b Struttura e Funzione delle Colinesterasi***

La neurotrasmissione colinergica è mediata dall'acetilcolina (ACh), che viene rapidamente idrolizzata ad opera di due colinesterasi, l'Acetilcolinesterasi (AChE) e la Butirilcolinesterasi (BuChE). AChE e BuChE sono due serina proteasi, presenti nei vertebrati che differiscono per localizzazione e specificità al substrato. Mentre, infatti, l'AChE è maggiormente presente nei muscoli e nel sistema nervoso, la BuChE viene sintetizzata principalmente nel fegato e secreta nel plasma, ed è presente nel siero, nelle cellule emopoietiche, nei polmoni, nel cuore e nelle sinapsi colinergiche del SNC.

AChE e BuChE possiedono il 65% di omologia nonostante vengano codificate da geni diversi su cromosomi diversi e sono entrambe in grado di idrolizzare l'ACh con una velocità maggiore di 10'000 molecole al secondo.<sup>37,38</sup>

La cristallografia a raggi X ha evidenziato che entrambi gli enzimi possiedono un canale d'accesso (*active site gorge*) al substrato profondo circa 20 Å che conduce al sito catalitico ove è presente la triade catalitica responsabile dell'idrolisi dell'ACh, costituita per entrambe da un residuo di His, Ser e Glu e da un residuo di Trp che coadiuva la catalisi. Una volta raggiunto il sito catalitico, l'ACh si lega in due punti:

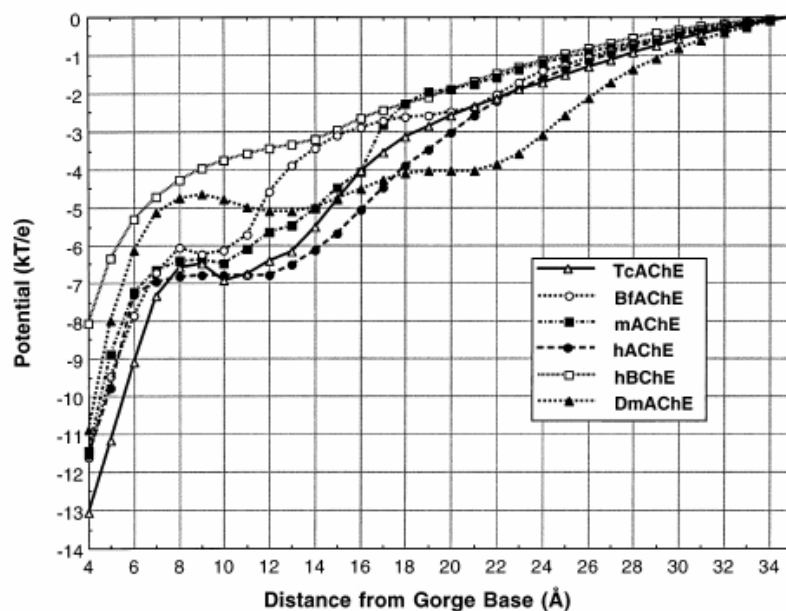
un sito vicino alla base del gorge (ove si trova la triade catalitica) ed un sito di legame per la colina, a metà di questo canale. L'idrolisi enzimatica fornisce acido acetico e colina e comporta la disattivazione del neurotrasmettitore.<sup>37</sup>

In un cervello normale, l'AChE provvede all'80% dell'attività colinesterasica, mentre la BuChE contribuisce a quest'attività per il restante 20%.<sup>38</sup> Mentre infatti l'AChE è altamente selettiva per l'ACh, la BuChE è meno substrato-specifica (è ancora oggetto di dibattito quale sia il suo substrato naturale), e provvede, al metabolismo di diversi substrati inclusi alcuni peptidi neuroattivi.<sup>39</sup> Questa minore specificità è principalmente dovuta alle diverse dimensioni e composizione dell'*active site gorge* dei due enzimi.

In particolare, l'*active site gorge* dell'AChE presenta dimensioni più ridotte rispetto a quello della BuChE, a causa della presenza di diversi amminoacidi aromatici le cui catene laterali sporgono nel lume del gorge.

Nella BuChE, invece, questi residui sono sostituiti da amminoacidi alifatici che lasciano, quindi, uno spazio maggiore, seppur con una forma più definita, per l'entrata e l'accomodazione del substrato. Questa differente composizione amminoacidica, inoltre, conferisce un diverso gradiente elettronegativo al gorge dei due enzimi (Figura 1), più idrofilo e fortemente polarizzato per l'AChE, più idrofobo e meno polarizzato per la BuChE.





**Figura 1.** Gradiente del potenziale elettrostatico lungo il gorge delle colinesterasi.

L'AChE, inoltre, possiede un sito anionico situato all'entrata del gorge (PAS), che non trova corrispondenza nella BuChE<sup>40,41,42</sup> e che garantisce un più veloce reclutamento e attrazione del substrato dal mezzo verso il gorge.

A tal proposito va aggiunto che mentre per l'AChE è ormai certa l'attività "classica" esterasica, il ruolo fisiologico della BuChE resta ancora da chiarire. Diverse evidenze sperimentali, tuttavia suggeriscono per questo enzima un ruolo compensatorio, fisiologico e patologico, all'attività dell'AChE. Studi recenti hanno infatti dimostrato l'esistenza di neuroni colinergici (circa il 10-15%) che utilizzano come enzima metabolico la BuChE<sup>43,44</sup> e che topi knockout per il gene dell'AChE sono in grado di sopravvivere in presenza di livelli normali di BuChE.<sup>38</sup> D'altro canto, nell'AD avanzato si verifica una diminuzione dell'85-90% dei livelli di AChE

con un concomitante aumento dei livelli di BuChE,<sup>38</sup> suggerendone quindi un ruolo compensatorio anche nel processo patologico.

AChE e BuChE devono essere considerati enzimi multifunzionali, caratterizzati non solo dalla loro funzione classica esterasica, necessaria per terminare la trasmissione sinaptica, ma anche da funzioni “non classiche”, non correlate alla loro funzione idrolitica.<sup>45</sup> In condizioni fisiologiche e patologiche, i ruoli non classici dell’AChE includono la modulazione dell’attivazione delle cellule gliali, partecipazione nell’ematopoiesi, crescita neuritica, fosforilazione di *tau*, attività del tipo di proteine d’adesione, e la promozione dell’aggregazione dell’amiloide. Tutte queste funzioni coinvolgono il PAS e/o altri siti di superficie dell’AChE e sono strettamente correlate a specifiche conformazioni della proteina, sensibili alle concentrazione dei metalli, che suggeriscono l’esistenza di un alto grado di flessibilità nella struttura delle colinesterasi. Coerentemente, studi NMR e di spettroscopia Raman hanno dimostrato l’esistenza di movimenti multipli dell’AChE che sottendono a diverse forme strutturali/funzionali dell’enzima.

### ***3.1c Ruolo delle Colinesterasi nell’AD***

Di particolare interesse è il coinvolgimento delle colinesterasi nel processo patologico che sottende all’insorgere e al progredire dell’AD.

Nell’Alzheimer avanzato si verifica una diminuzione dell’85-90% dei livelli di AChE con un concomitante aumento dei livelli di BuChE e delle cellule gliali che

provvedono alla sua espressione e sintesi.<sup>38</sup> La ratio BuChE/AChE nelle zone corticali affette da AD, passa da 0.5 a 11<sup>46</sup> e questo sembra avvalorare l'ipotesi di un ruolo cruciale della BuChE durante il progredire della malattia. La deplezione di AChE e l'aumento di BuChE causano uno scompenso tra sintesi/rilascio sinaptoriale dell'ACh e la sua idrolisi enzimatica.

E' stato, inoltre, dimostrato che l'AChE è intimamente coinvolta nei processi patologici che sottendono alla formazione e alla deposizione delle fibrille di A $\beta$  e che essa è in grado di aumentare drammaticamente la tossicità del peptide. In accordo con ciò, nei cervelli affetti da AD si verifica un incremento dei livelli di AChE intorno alle placche amiloidee e ai reticoli neurofibrillari. Recenti studi indicano, inoltre, che l'AChE lega il  $\beta$ -amiloide aumentandone notevolmente la tossicità e induce la formazione delle fibrille,<sup>47</sup> formando con esse un complesso macromolecolare<sup>48</sup>. Dal momento che PAS inibitori<sup>49</sup> e anticorpi monoclonali in grado di riconoscere il PAS<sup>50</sup> bloccano gli effetti amiloidogenici dell'AChE, è proprio nel sito periferico anionico dell'AChE<sup>51</sup> che si identifica il motivo specifico responsabile dell'interazione dell'AChE con A $\beta$ . A suffragare questa ipotesi, vi è la corrispondenza tra alcune caratteristiche enzimatiche anormali dell'AChE nelle placche e nei reticoli (come per esempio il pH ottimale e la sensibilità agli inibitori) dell'AD e le proprietà dell'AChE legata all'amiloide nelle fibrille in vitro.<sup>52</sup>

Anche la BuChE sembra essere coinvolta nell'aggregazione dell'amiloide nelle placche senili, essa, infatti, è stata individuata in queste formazioni suggerendo un suo ruolo nella maturazione delle placche.<sup>38,53</sup> Aumentati livelli di BuChE sono

associati con lo sviluppo delle placche neuritiche corticali e neocorticali. Quando la BuChE viene aggiunta al  $\beta$ -amiloide in un tessuto in coltura, essa ne amplifica la neurotossicità, confermando il potenziale ruolo dell'inibizione della BuChE nell'AD.

Mesulam et al.<sup>53</sup> hanno dimostrato che la BuChE si associa alle placche amiloidee proprio quando  $A\beta$  comincia ad assumere una conformazione compatta di foglietto  $\beta$ . Inoltre, secondo questi studi, la BuChE potrebbe partecipare alla trasformazione del  $\beta$ -amiloide da una forma benigna ad una maligna coinvolta nella degenerazione dei tessuti neuritici e nella demenza clinica.

Alla luce di queste conoscenze, ha assunto sempre più valore negli anni l'utilizzo in terapia di inibitori in grado di agire su entrambi gli enzimi. Sebbene, infatti, l'inibizione addizionale della BuChE nel trattamento dell'AD sia stata a lungo motivo di dibattito, sempre maggiori evidenze sperimentali identificano nella contemporanea inibizione dei due enzimi la strategia terapeutica più efficace al trattamento dell'AD. A conferma di ciò, infatti, gli studi clinici condotti su pazienti affetti da AD trattati con un ChEI, la rivastigmina (Exelon)<sup>54</sup>, hanno dimostrato una efficacia terapeutica di gran lunga superiore agli inibitori selettivi per la sola AChE.

Alla luce di quanto illustrato emerge che le colinesterasi sono enzimi multifunzionali caratterizzati non solo dalla funzione esterasica “classica”, necessaria per terminare la trasmissione sinaptica, ma anche da funzioni, genericamente definite “non classiche”, che non risultano essere in alcun modo correlate con la loro funzione idrolitica. L'esistenza di tali funzioni presuppone un'elevata flessibilità conformazionale per questi enzimi ed una stretta correlazione tra la fluttuazione

attraverso stati conformazionali diversi e le diverse funzioni esplicate. Coerentemente, l'AChE e la BuChE esistono in molteplici varianti strutturali e forme oligomeriche, e studi NMR e di spettroscopia Raman hanno confermato l'esistenza di movimenti multipli per l'AChE.

Se si pensa, infine, al ruolo patologico svolto dall'AChE nell'AD, risulta chiaro che affinché essa possa dar luogo ad interazioni anomali con A $\beta$  e alla sua aggregazione, è necessario che vada incontro al fenomeno di *misfolding* e quindi ad un significativo cambiamento conformazionale.

Nel SNC l'AChE è presente in un'unica variante catalitica, definita variante T dell'AChE (AChE<sub>T</sub>: tailed). La maggior parte dell'AChE<sub>T</sub> si ritrova ancorata alle membrane neuronali in forma tetrameric, attraverso il legame con un peptide poliprolinico chiamato PriMA.<sup>55</sup> Nell'AD tale variante diminuisce ed aumenta l'AChE associata a materiale insolubile extracellulare, e questa forma di AChE mostra caratteristiche enzimatiche differenti dall'enzima normalmente associato alle membrane neuronali. L'esistenza di numerose varianti dell'AChE, insieme con l'associazione delle sub-strutture dell'AChE a diversi domini e proteine, risulta in una varietà di stati conformazionali per questo enzima che distinguono forme oligomeriche diverse con diverse funzioni, incluso l'abilità di sentire e rispondere a vari insulti di stress.

La BuChE, invece, esiste in una singola subunità catalitica, corrispondente alla variante AChE<sub>T</sub> ed è stato recentemente dimostrato che, parimenti all'AChE, anch'essa è in grado di formare un tetramero anfifilico ancorato al peptide PriMA.

La relazione tra le fluttuazioni dell'AChE, specialmente nel gorge, e le sue funzioni è stata oggetto di un'intensa ricerca da parte di biochimici (Radic and co-workers)<sup>56</sup>, chimici strutturali (Sussman & Silman)<sup>57,58</sup> e chimici computazionali (McCammon e collaboratori).<sup>59</sup>

L'AChE in forma libera (non legata ad alcun ligando) fluttua attraverso stati conformazionali multipli ed il binding di un ligando a specifici siti, ne induce un significativo cambiamento conformazionale che si trasmette cooperativamente ad altre sub-strutture dell'enzima. Un esempio è dato dalla modulazione allosterica reciproca esistente tra il PAS ed il sito catalitico dell'enzima (CAS) che viene mediata dai residui amminoacidici presenti lungo *l'active site gorge*.

In particolare, la comunicazione reciproca (cross talk) tra il residuo W286 del PAS ed il residuo W86 presente nel CAS (numerazione dell'AChE umana) sembra giocare un ruolo cruciale nella modulazione dell'attività dell'AChE. I ligandi del PAS, infatti, sono in grado di interferire con la transizione conformazionale (da attiva a non attiva) di amminoacidi chiave del CAS, quali il W86 e Y337.

In maniera simile, i cambiamenti conformazionali del PAS sono correlati alla chiusura del  $\Omega$ -loop cisteinico C69-C96 sul W286. In accordo con ciò, movimenti macroscopici sono stati dimostrati esistere lungo il gorge dell'AChE di topo (*mAChE*), quando due ligandi del PAS, la fasciculina II e il propidio, sono ad esso legati. D'altro canto l'esistenza di una attività catalitica residua della *mAChE* in complesso con la fasciculina II lascia ipotizzare la presenza di strade d'accesso per il ligando alternative al sito catalitico (per esempio la back door).

## 3.2 SCOPO DEL LAVORO

Affinché sia possibile identificare i cambiamenti conformazionali di una proteina, responsabili delle sue diverse forme strutturali e funzionali, è necessario effettuare una caratterizzazione a livello molecolare della proteina stessa e identificare in essa i residui amminoacidici e/o le regioni (motivi o domini proteici) che possono promuovere e direzionare tali cambiamenti. A tal proposito, gli studi sull'interazione tra i piccoli ligandi e le proteine, nonché quelli relativi alle interazioni proteina-proteina, suggeriscono l'esistenza di porzioni strutturali strategiche, chiamati hot spots e presenti nelle proteine, le quali contribuiscono significativamente all'energia di binding del complesso.

Wells e i suoi collaboratori hanno dimostrato che solo un piccolo set di hot spots presenti all'interfaccia delle proteine può contribuire significativamente all'energia di binding di un macrocomplesso proteico.<sup>60</sup>

Su queste basi una promettente strategia di progettazione risiede quindi nello sviluppo di piccoli ligandi in grado di interagire con suddetti hot spots, così da impedire il possibile cambiamento conformazionale della proteina, e, conseguentemente, interferire con i processi biologici di cui esso è responsabile.

Partendo dall'analisi delle sub-strutture che compongono l'*active site gorge* dell'AChE (Tabella 1), e che, attraverso residui amminoacidi coinvolti nelle interazioni proteina-proteina, ne guidano e direzionano le fluttuazioni conformazionali, il mio lavoro di ricerca è stato rivolto alla progettazione di piccoli

ligandi in grado di modulare l'attività dell'enzima, interagendo fortemente con queste sub-strutture (collegate attraverso gli hot spots), e di impedirne, conseguentemente, i movimenti.

**Tabella 1.** Sub-strutture chiave che compongono l'active site gorge di *hAChE* e *hBuChE*.

<b>Regioni</b>	<b>Residui hAChE</b>	<b>Residui hBuChE</b>
<b>Regione His Catalitica</b>	429-455	420-446
<b>Regione Glu Catalitico</b>	326-359	317-350
<b>Regione Ser Catalitica</b>	199-209	194-204
<b><math>\Omega</math>-loop</b>	69-96	65-92
<b>Muro delle Gly</b>	117-134	112-129
<b>PAS</b>	279-297	270-288

In accordo con ciò, tenendo conto dell'eterogeneità conformazionale delle colinesterasi, è stata eseguita un'approfondita analisi computazionale e bioinformatica delle strutture cristallografiche ad oggi depositate in Protein Data Bank per questi enzimi e, le informazioni così ottenute, sono state poi utilizzate per lo sviluppo di una nuova serie di potenti inibitori.

In particolare, l'analisi dell'*active site gorge* di questi enzimi ha consentito l'individuazione di: i) una serie di cluster amminoacidici, parte di domini e/o di motivi di interazione proteina-proteina, potenzialmente coinvolti nelle fluttuazioni conformazionali di queste proteine (hot spots), e ii) del loro ruolo nell'interazione con l'inibitore.



L'ipotesi di progettazione è stata quindi che la contemporanea interazione di un inibitore “multisito” (in grado cioè di interagire con più punti della proteina) con più hot spots presenti lungo il gorge delle colinesterasi, potesse intrappolare i residui cruciali dell'enzima, parte di domini o motivi d'interazione proteina-proteina, in una particolare conformazione, riducendone la capacità a promuovere le fluttuazioni della proteina stessa e migliorando, di conseguenza, la potenza dell'inibizione.

Dal momento che l'eterogeneità conformazionale delle colinesterasi è direttamente correlata alle loro funzioni “classiche” e “non classiche”, un inibitore sufficientemente potente dovrebbe in linea di principio essere abile a “congelare” la conformazione che sottende alla funzione classica dell'enzima, così da prevenire non solo l'idrolisi dell'ACh, migliorandone quindi il deficit che si manifesta nell'AD, ma anche il passaggio alle conformazioni responsabili delle funzioni “non classiche” di questi enzimi, prevenendone quindi i processi patologici a cui esse danno vita.

Il lavoro che segue descrive l'approfondita indagine topologica dell'*active site gorge* delle colinesterasi e la conseguente identificazione di hot spots chiave presenti lungo di esso, l'interazione con i quali, ha condotto allo sviluppo di alcuni dei più potenti inibitori ad oggi conosciuti delle colinesterasi (Tabella 1 di Risultati e Discussione).

Sulla base, infatti, dell'ipotesi di progettazione seguita e attraverso l'analisi dei movimenti strutturali degli hot spots identificati, sono stati sviluppati il composto **3d**, il più potente inibitore dell'AChE, ed una serie di suoi analoghi caratterizzati da diversi profili di selettività.

E' chiaro che questo approccio può rappresentare una strada valida ed alternativa allo sviluppo di inibitori selettivi delle funzioni classiche e non classiche delle colinesterasi umane.

### 3.3 MATERIALI E METODI

Tutti gli studi di modellistica molecolare sono stati eseguiti su calcolatori *Silicon Graphics* SGI Origin 200 8XR12000, ed il lavoro di grafica molecolare è stato eseguito su calcolatori SGI Octane 2 e Octane.

Le strutture cristallografiche dell'AChE e della BuChE sono state scaricate dalla Protein Data Bank (PDB, <http://www.rcsb.org/pdb/>; codici PDB: 1B41, 1ACJ, 1Q83, 1Q84, 2CEK, 1P0I). Gli atomi di idrogeno sono stati aggiunti a tutte le strutture della PDB considerando un valore di pH di 7.2. Al fine di introdurre i nuovi composti nel sito attivo delle strutture cristallografiche dell'AChE (1B41) e della BuChE (1P0I) umane, i ligandi in esse presenti, Fasciculina-II e il prodotto di idrolisi Butirrilcolina, sono stati rimossi mediante l'utilizzo del comando di *unmerge* nel modulo Biopolymer di Insight2005 (Accelrys, San Diego). Le molecole di acqua presenti nelle strutture cristallografiche sono state mantenute, ad eccezione di quelle sovrapposte stericamente al ligando.

I nuovi composti progettati **3a-m** sono stati costruiti utilizzando il modulo Builder di Insight2005. I valori di pKa apparente sono stati calcolati mediante l'utilizzo del software ACD/labs pKa DB 10.00 (Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Canada). In accordo con essi, le porzioni taciniche di tutti i composti selezionati ed i gruppi amminici dei composti **3b**, **3d-h** sono stati considerati protonati in tutti i calcoli eseguiti (Tabella 1).

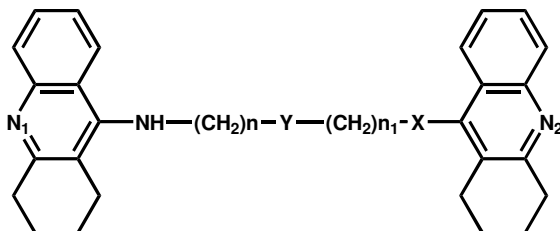
Le cariche parziali dei composti protonati sono state assegnate confrontando le cariche parziali assegnate dal campo di forza CVFF<sup>61</sup> con quelle calcolate mediante il metodo semiempirico MNDO<sup>62</sup> 1SCF, sia sui composti in forma neutra che in forma ionizzata. In particolare, le cariche parziali assegnate dal campo di forza sono state addizionate alla differenza algebrica tra le cariche parziali calcolate mediante MNDO sulla forma protonata e quelle calcolate sulla forma neutra, mediante l'esecuzione di un file di comando in linguaggio bcl precedentemente sviluppato.

Lo spazio conformazionale dei composti **3a-m** è stato campionato attraverso 200 cicli di *Simulated Annealing* (campo di forza CVFF), mediante l'esecuzione di un nostro protocollo standard.<sup>63</sup> In particolare, allo scopo di superare tutte le barriere torsionali possibili, una temperatura iniziale di 1000 K è stata applicata al sistema per 1000 fs e successivamente essa è stata linearmente ridotta a 200 K attraverso un decremento di 0,5 K/fs.

Le strutture risultanti sono state sottoposte ad una minimizzazione energetica utilizzando il modulo *Discover* di Insight 2005 (campo di forza CVFF, algoritmo di calcolo *Conjugate Gradient*,<sup>64</sup> costante dielettrica  $\epsilon=80 \cdot r$ ) fino ad arrivare ad un valore di RMS (deviazione quadratica media) della derivata massima minore di 0.001 kcal/Å.

I conformeri così ottenuti sono stati classificati in base al valore della loro energia conformazionale. In particolare, sono stati considerati quali punti di partenza per i successivi calcoli di docking tutte le strutture a conformazione distesa con un  $\Delta E$  dal minimo energetico globale ( $\Delta E_{GB}$ ) inferiore al valore di 20 Kcal/mol.

**Tabella 1.** Valori di pKa calcolati per i composti **2a-l** e **3a-m**



Cmpd	Y	n	n2	X	pKa			% mono-prot	% di-prot	% Tri-prot
					N1	Y	N2			
<b>2a</b>	CH <sub>2</sub>	3	4	S	9.10		6.03	92.30	6.54	
<b>2b</b>	N(Me)	3	3	NH	9.41	9.17	8.62	0.04	3.62	96.34
<b>2c</b>	N(COMe)	3	3	NH	9.33		8.73	2.85	97.13	
<b>2d</b>	N(COMe)	3	3	S	9.03		5.96	92.96	5.66	
<b>2e</b>	N(Me)	3	4	S	8.92	9.32	5.97	1.75	92.57	5.66
<b>2l</b>	N(COMe)	3	4	S	9.03		6.01	92.96	5.66	
<b>3a</b>	N(COMe)	4	3	S	8.37		5.93	88.90	4.77	
<b>3b</b>	NH <sub>2</sub>	4	3	S	8.35	10.11	5.88	6.60	89.12	4.27
<b>3c</b>	N(COMe)	3	4	NH	8.01		8.62	12.92	86.59	
<b>3d</b>	N(Me)	3	4	NH	7.97	9.66	8.56	0.58	13.91	85.48
<b>3e</b>	N(Et)	3	4	NH	7.95	9.61	8.55	0.65	14.45	84.90
<b>3f</b>	N(allyl)	3	4	NH	8.38	7.85	8.93	1.12	17.16	81.71
<b>3g</b>	N(β-hydroxyEt)	3	4	NH	8.41	7.87	8.99	1.01	16.59	82.39
<b>3h</b>	piperazine	3	3	NH	8.65	7.25	8.09	5.20	41.75	52.85
<b>3i</b>	2-(1,3)Ph-2	2	2	NH	8.71		9.31	2.98	97.00	
<b>3j</b>	2-(1,3)Pyr-2	2	2	NH	8.57	5.39	9.17	4.05	94.45	1.46
<b>3k</b>	1,4-phenyl	2	2	NH	8.72		9.32	2.91	97.07	
<b>3l</b>	5-Me-1,3-phenyl	2	2	NH	8.73		9.34	18.85	81.01	
<b>3m</b>	3,4-furyl	2	2	NH	8.68		9.27	3.25	96.73	

*a* Valori di pKa apparenti calcolati mediante l'utilizzo del software ACD/pKa DB 10.0 (Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Canada).

### 3.3a Scelta dei Parametri di Docking.

I parametri di docking sono stati opportunamente assegnati al sistema sulla base di una serie di test docking eseguiti sulle strutture cristallografiche dell'AChE con i

seguenti codici PDB: 2CEK, 1ACJ, 1Q83 e 1Q84. In particolare, partendo dai complessi in cui era stata manualmente modificata la conformazione iniziale del ligando, sono stati scelti i parametri che meglio hanno riprodotto la modalità di binding dei composti *anti1* e *syn1* TZ2PA6 (codici PDB, rispettivamente, 1Q84 e 1Q83) con la *mAChE*, del composto **2a** e della tacrina (codice PDB, rispettivamente, 2CEK e 1ACJ) con la *TcAChE* presente nelle corrispondenti strutture cristallografiche. Inoltre, al fine di investigare se i nostri composti fossero in grado di determinare un movimento del PAS simile a quello indotto dal composto **2a** nella *TcAChE* o dal composto *syn1* TZ2PA6 nella *mAChE*, sono state ulteriormente esplorate differenti procedure di docking.

In linea generale, i parametri del docking testati hanno riguardato sia la procedura di calcolo che la struttura del complesso di partenza. In particolare, per quanto riguarda la procedura di docking, sono stati variati i seguenti parametri di calcolo: i) il criterio di selezione energetica delle strutture generate (Metropolis o Energy Test); ii) il metodo di calcolo dell'energia di interazione non-bond (cell\_multipole, group\_based o quartic\_vdw\_no\_coul); iii) il contributo dei fattori di Coulomb e Van der Waals, e iv) l'applicazione di una griglia di solvatazione. Al fine di valutare, invece, quale fosse il miglior complesso di partenza, sono state variate: i) la conformazione di partenza della proteina; ii) la conformazione di partenza del ligando; iii) la grandezza dell'area di binding lasciata libera di muoversi durante il calcolo. In particolare, quale proteina di partenza è stata utilizzata la struttura cristallografica della *hAChE* (PDB: 1B41) con diverse orientazioni della catena

laterale del W286 (orientazione nativa, simile a quella presente in 2CEK, simile a quella presente in 1Q83) utilizzando il comando *Manual\_Rotamer* del modulo Biopolymer di Insight2005.

I risultati finali ottenuti sono stati poi classificati considerando: i) il valore di  $\Delta E$  della potenziale conformazione bioattiva del ligando rispetto al suo minimo relativo e globale, ed il corrispondente valore di RMS ottenuto per sovrapposizione degli atomi pesanti; ii) l'energia finale del complesso applicando la formula [ $E_{\text{binding}} = E_{\text{complesso}} - (E_{\text{proteina}} + E_{\text{ligando}})$ ]; iii) l'energia di interazione di non-bond tra il ligando e l'enzima (energia di vdW e di Coulomb; opzione: no CUT\_OFF; modulo Discover\_3 di Insight 2005).

### **3.3b Procedura di Docking**

I calcoli di docking flessibile dei composti **3a-m** in complesso con la hAChE e la hBuChE sono stati eseguiti mediante il modulo *Affinity* di Insight 2005, utilizzando una nostra procedura standard di *SA\_Docking*<sup>63</sup> (*Simulated Annealing Docking*) che considera tutto il sistema (proteina, ligando e molecole di acqua) flessibile. Poiché tale procedura richiede comunque una struttura di partenza formalmente ragionevole, i ligandi sono stati manualmente orientati nel sito attivo dell'enzima sulla base dei risultati precedenti<sup>63</sup> e dell'orientazione della tacrina e del composto **2a** nell'*active site gorge* della TcAChE (codice PDB rispettivamente: 1ACJ e 2CEK), sebbene nel

successivo protocollo di docking l'intero sistema venga comunque perturbato dal metodo *Monte Carlo* e dal *Simulated Annealing*.

Allo scopo di ottenere un numero più rappresentativo di risultati, inoltre, è stata ulteriormente incrementata la varianza dei complessi di partenza del docking. In particolare, poiché i composti **3c-g** presentano una distanza asimmetrica tra i linker che connettono il gruppo funzionale centrale e le due porzioni tacriniche, ognuno di questi composti è stato manualmente posizionato nell'*active site gorge* della *hAChE* e della *hBuChE* sia con il linker a 3 metileni che con quello a 4 metileni alla base del gorge, ed entrambi i complessi risultanti sono stati considerati punti di partenza del successivo calcolo di docking.

Su ogni ligando in complesso con la proteina, è stata effettuata una minimizzazione energetica all'interno del sito attivo utilizzando una *template force* di 10 Kcal/Å<sup>2</sup> (campo di forza CVFF, algoritmo di calcolo *Conjugate Gradient*, costante dielettrica  $\epsilon=80 \cdot r$ ) e la sua energia conformazionale è stata analizzata nuovamente per assicurarsi che rientrasse nell'intervallo di 20 Kcal/mol dal minimo energetico globale. La scelta dei punti di partenza per ogni complesso ligando/proteina è stata effettuata in seguito all'esame visivo dei risultati a più bassa energia ottenuti, posizionati nel sito attivo della 1P0I e della 1B41. Tutti i calcoli successivi sono stati eseguiti utilizzando come campo di forza il CVFF e la procedura di assegnazione delle cariche parziali precedentemente descritta. I complessi così ottenuti sono stati sottoposti ad una minimizzazione energetica preliminare (algoritmo di calcolo *Steepest Descent*;  $\epsilon=1$ ) fino ad un valore di RMS della derivata massima minore di



0,5 kcal/Å, per ottenere dei complessi dalla geometria approssimativamente ottimizzata, come richiesto dal protocollo di docking utilizzato. Successivamente, il docking flessibile dei ligandi negli enzimi è stato eseguito utilizzando il modulo *Affinity* di Insight 2005, scegliendo l'opportuna procedura di *SA\_Docking*<sup>65</sup> (*Simulated Annealing Docking*) ed il metodo *Cell\_Multipole*<sup>66</sup> per il calcolo delle interazioni di non legame. Per ciascun complesso enzima/inibitore è stato definito un area di binding intorno al ligando (*binding domain area*) lasciata completamente flessibile durante il calcolo e costituita da tutti i residui amminoacidici e le molecole d'acqua aventi almeno un atomo nel raggio di 5 Å dal ligando. Allo scopo di aumentare la libertà di movimento intorno al PAS, inoltre, la *binding domain area* è stata ulteriormente ampliata aggiungendo al raggio di 5 Å intorno a ligando tutti i residui e le molecole d'acqua aventi almeno un atomo nel raggio di 4 Å dal W286. In modo analogo si è proceduto per la *hBuChE*, aggiungendo all'intorno di 5 Å intorno al ligando tutti i residui e le molecole d'acqua aventi almeno un atomo nel raggio di 4 Å da F278. Tutti gli atomi inclusi nella *binding domain area* definita sono stati lasciati liberi di muoversi durante i calcoli del docking.

Il protocollo di docking utilizzato prevede l'iniziale generazione casuale di tutti i possibili complessi enzima/inibitore attraverso il metodo *Monte Carlo*, consentendo la completa libertà di movimento sia per gli amminoacidi inclusi nella *binding domain area* che per il ligando. Coerentemente, al fine di garantire un'ampia varianza delle strutture generate da sottoporre a successiva minimizzazione energetica sono stati applicati i seguenti parametri:

a) *energy tolerance* di  $10^6$  Kcal/Mol

b) energia di Van der Waals, scalata del 90% (*scale factors* = 0,1)

c) energia di Coulomb, scalata del 90% (*scale factors* = 0,1)

b) e c) sono stati scalati del 90% (*scale factors* = 0,1) per evitare grosse divergenze tra l'energia di Coulomb e l'energia di Van der Waals e consentire una ricerca conformazionale del ligando, all'interno del sito attivo, completa. Durante questo step, infatti, il ligando viene mosso attraverso una combinazione casuale di movimenti traslazionali, rotazionali e torsionali (opzione *Flexible\_Ligand*, considerando tutti i legami ruotabili), al fine di campionare sia lo spazio conformazionale del ligando che la sua orientazione rispetto all'enzima, il quale a sua volta viene considerato completamente flessibile. Le strutture di partenza così generate vengono poi sottoposte ad un processo di minimizzazione energetica (2500 iterazioni;  $\epsilon=1$ ) e selezionate, per un massimo di 20 strutture, in base a due diversi criteri: i) il *Metropolis test* ad una temperatura di 310 K; ii) un test di controllo della similitudine strutturale (RMS tolerance = 0.3 kcal/Å).

Sui complessi così ottenuti è stato successivamente eseguito il calcolo di dinamica molecolare attraverso 50 stadi di *Simulated Annealing* (SA). Durante questo processo, la temperatura è stata ridotta linearmente da 500 K a 300 K, in 50 passaggi della durata di 100 fs ognuno, e, contemporaneamente, i fattori scalari applicati alle energie di Van der Waals e di Coulomb sono stati progressivamente diminuiti dai loro valori iniziali (0.1) ai loro valori finali (1.0), così da valutare il contributo effettivo dei fattori sterici ed elettronici all'energia finale dei complessi. Al termine

dei calcoli di dinamica è stata effettuata una minimizzazione di  $10^5$  interazioni e i risultati ottenuti sono stati classificati in base alla loro energia potenziale.

I risultati finali sono stati classificati considerando: i) il valore di  $\Delta E$  della potenziale conformazione bioattiva del ligando dal suo minimo relativo e globale, ed il corrispondente valore di RMS ottenuto per sovrapposizione degli atomi pesanti; ii) l'energia finale del complesso applicando la formula [ $E_{\text{binding}} = E_{\text{complesso}} - (E_{\text{proteina}} + E_{\text{ligando}})$ ]; iii) l'energia di interazione non-bond tra il ligando e l'enzima (energia di vdW e di Coulomb; opzione no CUT\_OFF; modulo Discover\_3 di Insight 2005). Al termine dei calcoli di docking, i complessi ottenuti, che mostravano un buon compromesso tra il valore di energia potenziale ed il valore dell'energia di interazione ligando-enzima, sono stati sottoposti ad un'ulteriore minimizzazione (campo di forza CVFF,  $\epsilon=1$ ) utilizzando la combinazione degli algoritmi di calcolo *Steepest Descent* (fino ad un RMS sulla derivata massima minore di 0.1 Kcal/Å) e *Conjugate Gradient* (fino ad un RMS sulla derivata massima minore di 0.01 Kcal/Å). I risultati così ottenuti sono stati ulteriormente sottoposti alla valutazione dell'energia conformazionale e di interazione, al fine di selezionare la struttura che più di tutte potesse rappresentare la modalità di legame enzima-ligando. Anche in questo stadio finale, l'energia del ligando nella potenziale conformazione bioattiva è stata comparata con l'energia del minimo globale e con quella del minimo relativo e ne è stata calcolata la deviazione quadratica media (RMS) per sovrapposizione degli atomi pesanti.

La geometria delle interazioni  $\pi$ - $\pi$  è stata valutata considerando i seguenti parametri<sup>67,68,69</sup>:

- a) la distanza tra i centroidi degli anelli aromatici
- b) l'angolo tra i piani e gli anelli aromatici
- c) il valore di *offset* (sfalsamento) degli anelli aromatici
- d) la direzione vettoriale dei dipoli

### **3.3c Analisi Bioinformatica**

Tutte le strutture cristallografiche di *TcAChE*, *mAChE* e *hAChE* sono state scaricate dalla Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/>). Gli idrogeni sono stati aggiunti ad esse considerando un valore di pH di 7.2.

Una legenda dettagliata delle strutture cristallografiche analizzate è riportata in Tabella 2 della sessione di Risultati e Discussione del corrente capitolo.

Al fine di comparare la flessibilità osservata nei nostri studi di docking per alcuni residui della *hAChE* con quella presente nelle strutture cristallografiche analizzate, gli angoli diedri del backbone (phi e psi) e delle catene laterali (chi1 e chi2) di questi residui, sono stati calcolati e tabulati mediante l'utilizzo del comando *Residue\_Dihedral* del modulo Homology di Insight 2005. In particolare, sono stati considerati i seguenti residui dell'*AChE*: Y72, D74, W86, G120-G122, Y124, W286, Y337, Y341 e Y449 (numerazione della *hAChE*).

Una lista dettagliata dei valori ottenuti, sia per le strutture cristallografiche considerate che per i nostri risultati di docking, è riportata in Tabella 3 di Risultati e discussione. Le strutture cristallografiche, divise per specie (torpedo californica, topo ed umana) sono state raggruppate in base all'assenza o alla presenza dell'inibitore, ed in questo ultimo caso ulteriormente suddivise in base alla natura dell'inibitore.

Successivamente, tutte le strutture, inclusi i nostri risultati di docking, sono state organizzate in famiglie sulla base degli angoli diedri calcolati per i residui su menzionati, considerando: i) come valori di riferimento quelli calcolati per le forme native di AChE di torpedo e di topo (codice PDB: 1EA5 e 1J06, rispettivamente) ed ii) un valore di incremento dell'angolo di 30° dalla struttura di riferimento (Tabella 3 di Risultati e Discussione).

I motivi funzionali lineari presenti nell'AChE e nella BuChE umane sono stati identificati utilizzando il server *Eukaryotic Linear Motif* (<http://elm.eu.org/>) che consente di identificare piccoli siti funzionali su proteine eucariotiche così come quelli soggetti a modifiche post-traduzionali o coinvolti in interazioni proteina-proteina.<sup>(56)</sup>

Le strutture sperimentalmente determinate dei domini SH3 (PDB IDs: 1QWE, 1QWF) e dei motivi LxxLL (PDB IDs: 1SB0, 1T7F) sono state scaricate dalla PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/>) ed analizzate mediante l'utilizzo del server ConSeq (<http://conseq.bioinfo.tau.ac.il>). Le distanze tra i carboni C $\alpha$  e tra i centroidi delle catene laterali dei residui d'interazione sono state misurate e tabulate al fine di

utilizzarle quali distanze di riferimento per l'analisi successiva dei domini presenti nell'*active site gorge* della *hAChE* e della *hBuChE*.

L'identificazione dei residui coinvolti nei domini tipo SH3 presenti nei due enzimi umani ed il calcolo delle distanze dei C $\alpha$  e dei centroidi è stato eseguito attraverso l'utilizzo di un file di comando da me preparato (Insight2005, Accelrys, San Diego).

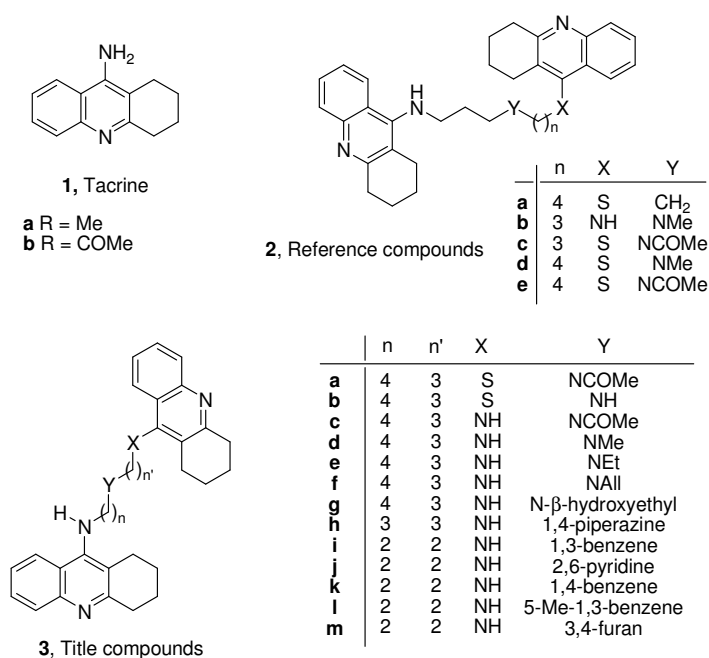
Una lista dettagliata dei domini e/o motivi di interazione proteina-proteina individuati lungo l'*active site gorge* della *hAChE* e della *hBuChE*, e delle distanze calcolate tra i residui responsabili delle interazioni, è riportata nelle tabelle 4 (domini del tipo SH3) e 5 (motivi del tipo LxxLL) della sessione di Risultati e Discussione del corrente capitolo.

### 3.4 RISULTATI E DISCUSSIONE

I composti progettati sono stati sintetizzati dal gruppo del Prof. Campiani presso l'Università di Siena, e testati sulle colinesterasi dalla Dr.ssa Ashima Saxena del Walter Reed Army Institute of Research (Maryland).

In uno studio precedentemente condotto dal gruppo di ricerca presso cui ho svolto il mio lavoro di dottorato, una prima investigazione dell'*active site gorge* delle colinesterasi aveva condotto allo sviluppo di una serie di potenti inibitori di questi enzimi, che i risultati di docking flessibile avevano dimostrato essere in grado di interagire fortemente con i residui amminoacidici considerati cruciali per l'inibizione dell'enzima.<sup>63</sup> I composti più rappresentativi della serie precedentemente sviluppata (**2a-e**, Schema 1) sono stati quindi ritestati sugli enzimi umani e i risultati sono riportati in Tabella 1.

**Schema 1.** Schema generale dei composti sviluppati.



**Tabella 1.** Costanti di inibizione dei composti **3a-m** e dei composti di riferimento su *hAChE* e *hBuChE*.

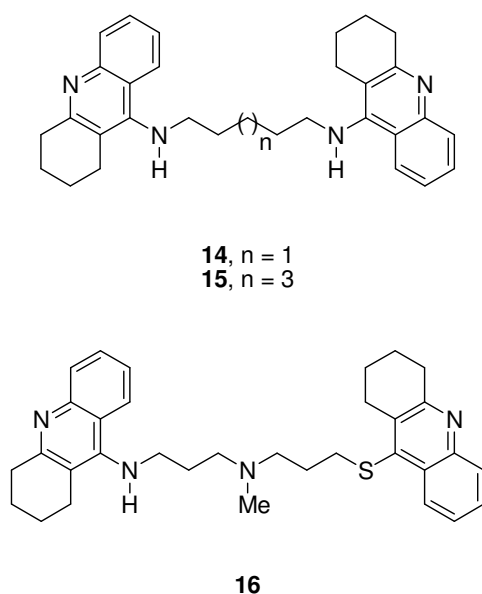
Cmpd	Tether	% prot <sup>a</sup>			<i>K<sub>i</sub></i> (pM) (± SEM)		<i>hAChE/hBuChE</i> ratio
		Mono	Di	Tri	<i>hAChE</i> <sup>b</sup>	<i>hBuChE</i> <sup>b</sup>	
<b>1</b>	-	-	-	-	36000 (1000)	7000 (2000)	-
<b>2a</b>	NH(CH <sub>2</sub> ) <sub>8</sub> NH	92	6	-	27950 (2420)	1650 (100)	16.9
<b>2b</b>	NH-3-N(Me)-3-NH	0	4	96	540 (29)	12130 (1600)	0.04
<b>2c</b>	NH-3-N(COMe)-3-S	93	6	-	13370 (1600)	3130 (390)	4.27
<b>2d</b>	NH-3-N(Me)-4-S	2	92	6	3990 (270)	8590 (540)	0.46
<b>2e</b>	NH-3-N(COMe)-4-S	93	6	-	5150 (170)	740 (100)	6.96
<b>3a</b>	NH-4-N(COMe)-3-S	89	5	-	20877 (2075)	270 (32)	77.04
<b>3b</b>	NH-4-NH-3-S	7	89	4	2672 (617)	779 (77)	3.42
<b>3c</b>	NH-3-N(COMe)-4-NH	13	87	-	247 (122)	725 (260)	0.34
<b>3d</b>	NH-3-N(Me)-4-NH	1	14	85	11.8 (1.2)	819 (112)	0.01
<b>3e</b>	NH-3-N(Et)-4-NH	1	14	85	162 (41)	435 (31)	0.37
<b>3f</b>	NH-3-N(All)-4-NH	1	17	82	84.7 (16.8)	4191 (414)	0.02
<b>3g</b>	NH-3-N(βOHEt)-4-NH	1	17	82	119.1 (31.8)	1187 (203)	0.10
<b>3h</b>	NH-3-Pip-3-NH	5	42	53	135.9 (19.3)	4427 (1150)	0.03
<b>3i</b>	NH-2-(1,3-Ph)-2-NH	3	97	-	1718 (390)	924 (125)	1.86
<b>3j</b>	NH-2-(2,5-Pyr)-2-NH	4	94	1	768 (115)	1872 (365)	0.41
<b>3k</b>	NH-2-(1,4-Ph)-2-NH	3	97	-	1630 (290)	13860 (1170)	0.12
<b>3l</b>	NH-2-(1,3-(5-MePh)-2-NH	19	81	-	7450 (580)	5040 (470)	1.48
<b>3m</b>	NH-2-(3,4-furan)-2-NH	3	97	-	13270 (3140)	7290 (860)	1.82
<b>15</b>	-	-	-	-	1300 (100) <sup>c</sup>	2000 (500) <sup>d</sup>	-
<b>16</b>	-	-	-	-	9100 (1000) <sup>c</sup>	4200 (800) <sup>d</sup>	-

<sup>a</sup>I valori di p*K<sub>a</sub>* apparenzi sono stati calcolati mediante l'utilizzo del software ACD/p*K<sub>a</sub>* DB 10.0 (Advanced Chemistry Development Inc., Toronto, Canada); <sup>b</sup> la *K<sub>i</sub>* è la media di almeno tre misurazioni; <sup>c</sup> i valori di *K<sub>i</sub>* per la *FBS AChE* e <sup>d</sup> *Eq BuChE* provengono dal riferimento 63b.



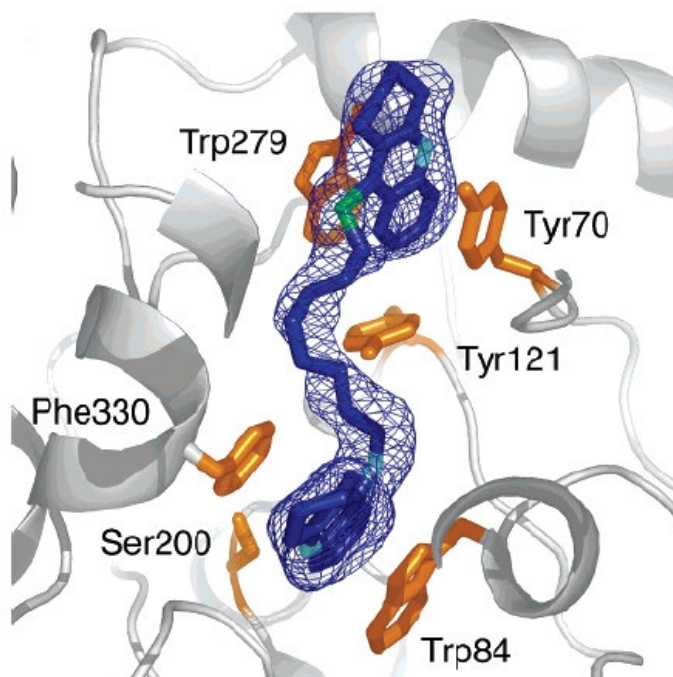
In particolare, il composto **2a** era stato progettato allo scopo di dimostrare la presenza di un sito periferico anche all'entrata del gorge della *h*BuChE ( $K_i$  *Eq*BuChE = 400 pM) mentre i composti **2b-e** erano stati appositamente progettati per interagire con differenti siti di riconoscimento presenti lungo l'*active site gorge* dell'AChE e della BuChE.<sup>63b</sup> In accordo con questa ipotesi di progettazione, il profilo di selettività dei composti **2a-e** viene conservato anche sulle colinesterasi umane (Tabella 1). Come precedentemente riportato, il numero di funzioni protonabili presenti sull'inibitore, risulta essere cruciale per ottenere un'attività inibitoria elevata sull'AChE ( $K_i$  *h*AChE: **2b**<**2c**<**2a**, Tabella 1) e l'introduzione di un atomo di zolfo sull'anello tetraidroacridinico (**2a**, **2c-e**), che riduce la protonabilità dell'azoto eterociclico del sistema acridinico (Tabella 1), conduce ad una maggiore selettività per la *h*BuChE rispetto alla *h*AChE (come avviene per esempio nel composto **2b** vs al composto **16**, Tabella 1 e Schema 2).<sup>63</sup>

**Schema 2.** Inibitori bivalenti di riferimento.



I calcoli di docking flessibile effettuati sui composti della serie precedente, avevano predetto la modalità di binding dei composti **2a**, **2d** e **2e** alla *hAChE*, orientando la porzione tacrinica dell'inibitore al CAS e quella tioacrdinica al PAS, in accordo con il gradiente elettronegativo presente lungo il gorge dei due enzimi.

La modalità di binding ipotizzata, è stata recentemente confermata dalla risoluzione della struttura cristallografica del composto **2a** in complesso con la *TcAChE* (Figura 1),<sup>70</sup> sebbene lo spostamento conformazionale osservato nella catena laterale del W279 non fosse stato osservato negli studi di docking condotti.



**Figura 1.** Struttura cristallografica della TcAChE in complesso con il composto **2a** (codice PDB: 2CEK).

Alla luce quindi del movimento osservato per il W279 nella struttura cristallografica di TcAChE in complesso con il composto **2a**, la procedura di docking

precedentemente utilizzata è stata ulteriormente implementata al fine di assicurare la predizione completa delle modalità di binding dei nuovi inibitori sviluppati.

Inoltre, al fine di analizzare le variazioni conformazionali indotte dall'inibitore in alcuni cluster amminoacidici, potenzialmente coinvolti nella fluttuazioni attraverso le diverse forme strutturali e funzionali delle colinesterasi, è stata eseguita un'approfondita analisi delle strutture cristallografiche delle colinesterasi depositate ad oggi nella PDB ed è stata effettuata un'accurata analisi bioinformatica per verificare se le variazioni conformazionali individuate potessero coinvolgere specifici domini di interazione proteina-proteina (hot spots) presenti lungo il gorge di questi enzimi. Tale approccio ha avuto quindi come scopo la progettazione di inibitori, che interagendo fortemente con gli hot spots individuati lungo il gorge, fossero in grado di adattarsi alle loro fluttuazioni, congelando l'enzima in una conformazione inattiva (*freeze-frame inhibitors*). Secondo questa ipotesi, infatti, il binding di un inibitore "multisito" potrebbe indurre un collasso dell'*active site gorge* intorno ad esso attraverso l'interazione incrociata con più hot spot dell'enzima, minimizzando le dimensioni del gorge e bloccandone i movimenti e le fluttuazioni.

### ***3.4a Analisi delle Strutture X-ray delle ChE***

Il mio lavoro di ricerca è partito dall'analisi dei cambiamenti conformazionali osservati nel gorge delle 87 strutture cristallografiche ad oggi depositate in PDB per l'AChE di Torpedo californica (*TcAChE*), topo (*mAChE*) ed uomo (*hAChE*). Le informazioni acquisite da questa analisi strutturale, sono state poi utilizzate per

rifinire il protocollo di docking flessibile, al fine di ottimizzare la simulazione dinamica tra gli inibitori sviluppati e le colinesterasi umane.

Nell'analisi condotta, è stata presa in considerazione anche la modalità di binding, l'attività inibitoria, e le strutture chimiche dei ligandi in complesso con l'AChE (Tabelle 2 e 3).

Le strutture da analizzare sono state inizialmente divise per specie di appartenenza, e, successivamente, classificate in base alla presenza/assenza dell'inibitore e, qualora esso fosse presente, in base alla sua natura (Tabella 2). Conseguentemente, nelle strutture cristallografiche considerate, sono state analizzate le eventuali variazioni conformazionali di amminoacidi chiave presenti lungo l'*active site gorge*, confrontandone la loro posizione relativa con quella presente nella struttura dell'apoenzima. In particolare, la variazione conformazionale di tali amminoacidi è stata valutata in termini di spostamento dalla posizione nativa, ovvero mediante differenza tra il valore degli angoli diedri del backbone ( $\phi$  e  $\psi$ ) e delle catene laterali ( $\chi_1$ ,  $\chi_2$ ) dell'amminoacido considerato ed il loro rispettivo valore nell'apoenzima (Tabella 3).

I dati così ottenuti hanno consentito la classificazione delle 87 strutture in base ai movimenti in esse osservati. Con la stessa metodologia quindi, sono stati analizzati e classificati anche i complessi *hAChE*/inibitore ottenuti dagli studi di docking flessibile effettuati (Tabella 3).

**Tabella 2 A:** Elenco delle strutture cristallografiche delle apoforme di AChE.

<b>codice<sup>a</sup> PDB</b>	<b>Specie</b>
1EA5	<i>TcAChE</i>
1QID	<i>TcAChE</i> danneggiata da un'intensa radiazione sincrotrona
1QIE	“
1QIF	“
1QIG	“
1QIH	“
1QII	“
1QIK	“
1QIM	“
1W75	Forma Ortorombica della <i>TcAChE</i>
1JO6	<i>MAChE</i>
1MAA	<i>MAChE</i>

**Tabella 2 B:** AChE in complesso con metalli.

<b>Codice<sup>a</sup> PDB</b>	<b>Complesso</b>
2J4F	<i>TcAChE</i> – derivato di Hg

**Tabella 2 C:** Complessi dell'AChE con substrato ed analoghi del substrato.

<b>codice<sup>a</sup> PDB</b>	<b>Complesso</b>	<b>Attività riportata<sup>b</sup></b>
1AMN	<i>TcAChE</i> /TMTFA	$K_{i_{TcAChE}} = 15 \cdot 10^{-12} \text{ M}$
2ACE	Native <i>TcAChE</i> /ACh (docked)	$K_{d_{mAChE(wt. ambenonium)}} = 0.054 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{56b}$ $K_{d_{mAChE(wt. decidium)}} = 0.079 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{56b}$
2C4H	<i>TcAChE</i> /ATCh(500 mM)	$K_{d_{mAChE(wt. ambenonium)}} = 0.046 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{56b}$ $K_{d_{mAChE(wt. decidium)}} = 0.16 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{56b}$

2C58	<i>TcAChE</i> /ATCh(20 mM)	$Kd_{mAChE(wt, ambenonium)} = 0.046 \cdot 10^{-3} M^{56b}$ $Kd_{mAChE(wt, decidium)} = 0.16 \cdot 10^{-3} M^{56b}$
2C5F	<i>TcAChE</i> /OTMA	$Ki_{mAChE} = 0.023 \cdot 10^{-3} M^{56b}$
2C5G	<i>TcAChE</i> /TCh (20 mM)	-
2H9Y	<i>mAChE</i> /TMTFA	$Ki_{TcAChE} = 15 \cdot 10^{-12} M^{71}$
2HA0	<i>mAChE</i> /4k-TMA	$Ki_{mAChE} = 0.023 \cdot 10^{-3} M$
2HA2	<i>mAChE</i> /SCh	$Ki_{mAChE} = 0.021 \cdot 10^{-3} M$
2HA3	<i>mAChE</i> /Ch	$Ki_{mAChE} = 1.4 \cdot 10^{-3} M$
2HA4	Mutante S203A <i>mAChE</i> /ACh	$Kd_{mAChE(S203A, ambenonium)} = 2 \cdot 10^{-3} M$
2HA5	Mutante S203A <i>mAChE</i> /ATCh	$Kd_{mAChE(S203A, ambenonium)} = 0.62 \cdot 10^{-3} M$ $Kd_{mAChE(S203A, decidium)} = 1.2 \cdot 10^{-3} M$
2HA6	Mutante S203A <i>mAChE</i> /SCh	$Kd_{mAChE(S203A, ambenonium)} = 0.048 \cdot 10^{-3} M$
2HA7	Mutante S203A <i>mAChE</i> /BTCh	$Kd_{mAChE(S203A, ambenonium)} = 0.44 \cdot 10^{-3} M$ $Kd_{mAChE(S203A, decidium)} = 0.76 \cdot 10^{-3} M$

**Tabella 2 D:** Complessi covalenti dell'AChE con inibitori irreversibili (organofosfati e carbammati).

<b>codice<sup>a</sup> PDB</b>	<b>Complesso</b>	<b>Attività<sup>b</sup></b>
1CFJ	<i>TcAChE</i> Invecchiata /Sarin	$Ki_{bovAChE}^{72} = 7.4 \cdot 10^5 M^{-1} min^{-1}$
1SOM	<i>TcAChE</i> Invecchiata/Soman	$Kd_{electricelAChE} = 6.1 \cdot 10^{-7} M$
1VXO	<i>TcAChE</i> Invecchiata /VX	$Ki_{bovAChE}^{72} = 6.6 \cdot 10^6 M^{-1} min^{-1}$
1VXR	<i>TcAChE</i> /VX	$Ki_{bovAChE}^{72} = 6.6 \cdot 10^6 M^{-1} min^{-1}$
2BAG	<i>TcAChE</i> /Ganstigmina	$IC_{50TcAChE} = 5.12 \cdot 10^{-6} M$
2DFP	<i>TcAChE</i> Invecchiata/DFP	$Kd_{TcAChE} = 70 \cdot 10^{-6} M$ ; $Kd_{hAChE} = 13 \cdot 10^{-6} M$ ;
1OCE	<i>TcAChE</i> /MF268	Resta irreversibilmente legato all'AChE di anguilla elettrica (periodo di giorni) <sup>73</sup>
2C0P	<i>mAChE</i> Invecchiata/Tabun	Riattivazione da TMB-4 minore del 5% (2 settimane)
2C0Q	<i>mAChE</i> /Tabun	Riattivazione da TMB-4 raggiunge il 62% (1 ora)

2JGE	<i>m</i> AChE/methamidophos	$Ki_{hAChE}^{74} = 1.9 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ $K_{ShAChE} = 0.239 \text{ h}^{-1}$
2JGF	<i>m</i> AChE/fenamiphos	$Ki_{hAChE}^{74} = 0.2 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$
2JGG	<i>m</i> AChE/sarin	$Ki_{hAChE}^{74} = 2.7 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$
2JGH	<i>m</i> AChE/VX	$Ki_{hAChE}^{74} = 1.2 \cdot 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ $K_{ShAChE} = 0.021 \text{ h}^{-1}$
2JGI	<i>m</i> AChE/DFP	$Ki_{hAChE}^{74} = 1.3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$
2JGJ	<i>m</i> AChE / methamidophos invecchiato	$Ki_{hAChE}^{74} = 1.9 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$ $K_{ShAChE} = 0.239 \text{ h}^{-1}$
2JGK	<i>m</i> AChE/ fenamiphos invecchiato	$Ki_{hAChE}^{74} = 0.2 \cdot 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$
2JGL	<i>m</i> AChE/ VX invecchiato e sarin	$Ki_{hAChE}^{74} = 2.7 \cdot 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$
2JGM	<i>m</i> AChE/ DFP invecchiato	$Ki_{hAChE}^{74} = 1.3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$

**Tabella 2 E: Complessi dell’AChE complexes con inibitori competitive reversibili.**

codice <sup>a</sup> PDB	Complesso	Attività <sup>b</sup>
1ACJ	<i>Tc</i> AChE/Tacrina	$Ki_{TcAChE} = 4.0 \cdot 10^{-8} \text{ M}^{63}$ $IC_{50bovAChE} = 4.45 \cdot 10^{-7} \text{ M}^{52}$
1AX9	<i>Tc</i> AChE/Edrofonio	$IC_{50bovAChE} = 5.36 \cdot 10^{-6} \text{ M}^{52}$
1DX6	<i>Tc</i> AChE/(-)-galantamina	$IC_{50TcAChE} = 6.52 \cdot 10^{-7} \text{ M};$ $IC_{50hAChE} = 3.5 \cdot 10^{-7} \text{ M};$ $IC_{50hBuChE} = 18.6 \cdot 10^{-3} \text{ M}$
1E66	<i>Tc</i> AChE/Uprina X	$Ki_{TcAChE} = 1.3 \cdot 10^{-10} \text{ M};$ $Ki_{hAChE} = 6.7 \cdot 10^{-10} \text{ M}$
1GPK	<i>Tc</i> AChE/(+)-Uperazina A	$Ki_{TcAChE} = 4.3 \cdot 10^{-3} \text{ M}$
1GPN	<i>Tc</i> AChE/(-)-Uperazina B	$Ki_{TcAChE} = 3.34 \cdot 10^{-7} \text{ M}$
1GQR	<i>Tc</i> AChE/rivastigmina	$Ki_{TcAChE} \text{ di carbamilazione} = 2.0 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$

		Riattivazione della $TcAChE$ <10%
		$Ki_{hAChE}$ di carbamilazione = $3300 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$
		Riattivazione di $hAChE$ 26%
1GQS	$TcAChE/NAP$	$Ki_{TcAChE} = 0.7 \cdot 10^{-6} \text{ M};$ $Ki_{hAChE} = 33 \cdot 10^{-6} \text{ M}$
1HBJ	$TcAChE/4\text{-amino-5-fluoro-2-methyl-3-(3-trifluoroacetylbenzylthiomethyl)quinoline}$	$IC_{50TcAChE} = 3.0 \cdot 10^{-9} \text{ M}$
1QTI	$TcAChE/galantamina$	$IC_{50TcAChE} = 6.52 \cdot 10^{-7} \text{ M}^{75}$ $IC_{50hAChE} = 3.5 \cdot 10^{-7} \text{ M}^{75}$ $IC_{50hBuChE} = 18.6 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{75}$
1VOT	$TcAChE/(-)\text{-uperazina A}$	$Ki_{TcAChE} = 1.75 \cdot 10^{-7} \text{ M};$ $IC_{50rAChE} = 1.14 \cdot 10^{-7} \text{ M}^{76}$
1W6R	$TcAChE/\text{derivato della galantamina}$	$IC_{50TcAChE} = 7.02 \cdot 10^{-7} \text{ M}$
2ACK	$TcAChE/Edrofonio$	$IC_{50bovAChE} = 5.36 \cdot 10^{-6} \text{ M}^{52}$

**Tabella 2 F:** Complessi dell'AChE con inibitori del PAS.

codice <sup>a</sup> PDB	Complesso	Attività <sup>b</sup>
1FSS	$TcAChE/Fasciculina-II$	$IC_{50bovAChE} = 24.9 \cdot 10^{-11} \text{ M}^{52}$
1J07	$mAChE/Decidio$	$Ki_{TcAChE} \sim 2.1 \cdot 10^{-8} \text{ M}$
1KU6	$mAChE/Fasciculina-II$	$IC_{50bovAChE} = 24.9 \cdot 10^{-11} \text{ M}^{52}$
1MAH	$mAChE/Fasciculina-II$	$IC_{50bovAChE} = 24.9 \cdot 10^{-11} \text{ M}^{52}$
1N5M	$mAChE/Gallamina$	$Ki_{TcAChE} = 15 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ $Ki_{hAChE} = 37 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ $IC_{50bovAChE} = 8.76 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{52}$
1N5R	$mAChE/Propidio$	$Ki_{TcAChE} \sim 3.7 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ $Ki_{mAChE} \sim 2.2 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ $IC_{50bovAChE} = 34.6 \cdot 10^{-6} \text{ M}^{52}$
1B41	$hAChE/Fasciculina-II$	$IC_{50bovAChE} = 24.9 \cdot 10^{-11} \text{ M}^{52}$



1F8U	Mutante E202Q <i>h</i> AChE/Fasciculina-II	$IC_{50\text{bovAChE}} = 24.9 \cdot 10^{-11} \text{ M}^{52}$
------	--------------------------------------------	--------------------------------------------------------------

**Tabella 2 G:** Complessi dell'AChE con inibitori bivalenti.

codice <sup>a</sup> PDB	Complesso	Attività <sup>b</sup>
1ACL	<i>Tc</i> AChE/Decametonio	$Ki_{mAChE} = 3.5 \cdot 10^{-6} \text{ M}^{77}$ $Ki_{hAChE} = 6 \cdot 10^{-3} \text{ M}^{78}$
1E3Q	<i>Tc</i> AChE/BW284C51	$Ki_{hAChE} = 10 \cdot 10^{-9} \text{ M}^{78}$ $Ki_{bovAChE} = 57.1 \cdot 10^{-9} \text{ M}^{52}$
1EVE	<i>Tc</i> AChE/E2020	$IC_{50TcAChE} = 5.7 \cdot 10^{-9} \text{ M}$
1H22	<i>Tc</i> AChE/( <i>S,S</i> )-(-)-bis(10)-upridone	$Ki_{TcAChE} = 0.8 \cdot 10^{-9} \text{ M};$ $IC_{50TcAChE} = 2.4 \cdot 10^{-9} \text{ M};$ $IC_{50rAChE} = 151 \cdot 10^{-9} \text{ M}$
1H23	<i>Tc</i> AChE/( <i>S,S</i> )-(-)-bis(12)-upridone	$Ki_{TcAChE} = 4.5 \cdot 10^{-9} \text{ M};$ $Ki_{rAChE} = 19.6 \cdot 10^{-9} \text{ M};$ $IC_{50TcAChE} = 16 \cdot 10^{-9} \text{ M};$ $IC_{50rAChE} = 52 \cdot 10^{-9} \text{ M}$
1JJB	<i>Tc</i> AChE/Peg-SH	Aumento della Km apparente per la ATCh da 0.080 ( $\pm 0.015$ ) a $1.0 (\pm 0.3) \cdot 10^{-3} \text{ M}$
1ODC	<i>Tc</i> AChE/tacrina(8)-4-amminochinolina	$IC_{50rAChE} = 8.8 \cdot 10^{-9} \text{ M};$ $IC_{50rBuChE} = 110 \cdot 10^{-9} \text{ M}$
1U65	<i>Tc</i> AChE/CPT-11	$Ki_{TcAChE} = 26.4 \cdot 10^{-9} \text{ M};$ $Ki_{hAChE} = 50.5 \cdot 10^{-9} \text{ M}$
1UT6	<i>Tc</i> AChE/ <i>N</i> -9-(1',2',3',4'-tetrahydroacridinyl)-1,8-diamminooctane	$IC_{50rAChE} = 1.5 \cdot 10^{-9} \text{ M};$ $IC_{50rAChE} = 149 \cdot 10^{-9} \text{ M}$
1W4L	<i>Tc</i> AChE/derivato della galantamina	$IC_{50TcAChE} = 4 \cdot 10^{-9} \text{ M}$
1W76	Orthorhombic <i>Tc</i> AChE/derivato della galantamina	$IC_{50TcAChE} = 499 \cdot 10^{-9} \text{ M}$
1ZGB	<i>Tc</i> AChE/(R)-tacrine(10)-upridone	See 1ZGC

1ZGC	<i>TcAChE</i> /(RS)-tacrine(10)-upridone	$IC_{50rAChE} = 8.8 \cdot 10^{-9} \text{ M}$ $IC_{50rBuChE} = 81.5 \cdot 10^{-9} \text{ M}$
2CEK	<i>TcAChE</i> / <b>2a</b>	$Ki_{hAChE} = 27.95 \cdot 10^{-9} \text{ M}$
2CKM	<i>TcAChE</i> / <b>15</b>	$IC_{50rAChE} = 1.5 \cdot 10^{-9} \text{ M}$ $IC_{50rBuChE} = 149 \cdot 10^{-9} \text{ M}$
2CMF	<i>TcAChE</i> / <b>14</b>	$IC_{50rAChE} = 28 \cdot 10^{-9} \text{ M}$ $IC_{50rBuChE} = 329 \cdot 10^{-9} \text{ M}$
1Q83	<i>mAChE</i> / <i>syn</i> TZ2PA6	$Ki_{TcAChE} = 77 \cdot 10^{-12} \text{ M}$ $Ki_{mAChE} = 410 \cdot 10^{-12} \text{ M}$ $Ki_{mBuChE} = 720 \cdot 10^{-12} \text{ M}$
1Q84	<i>mAChE</i> / <i>anti</i> TZ2PA6	$Ki_{mAChE} = 8900 \cdot 10^{-12} \text{ M}$ $Ki_{TcAChE} = 720 \cdot 10^{-12} \text{ M}$ $Ki_{mBuChE} = 460 \cdot 10^{-12} \text{ M}$

**Tabella 2 H: Complessi dell'AChE con riattivatori (antidoti).**

PDB code <sup>a</sup>	Complex	Activity <sup>b</sup>
2GYU	<i>mAChE</i> /HI-6	VX/ <i>rAChE</i> $Kr = 130 \cdot 10^{-6} \text{ M}^{79}$
2GYV	<i>MAChE</i> /ortho7	$Ki_{mAChE} = 1.3 \cdot 10^{-6} \text{ M}^{80}$
2GYW	<i>mAChE</i> /Obidoxime	VX/ <i>rAChE</i> $Kr = 562 \cdot 10^{-6} \text{ M}^{79}$

<sup>a</sup> I riferimenti delle strutture cristallografiche sono quelli riportati nella protein data bank per il codice PDB corrispondente; <sup>b</sup> l'attività dei composti è quella riportata nei riferimenti PDB con l'eccezione di quelli indicati direttamente in tabella.

**Tabella 3 A:** Angoli Diedri Calcolati per il residuo Y72 dell'AChE.

<b>Codice PDB</b>	<b>phi</b>	<b>psi</b>	<b>chi1</b>	<b>chi2</b>	<b><math>\Delta\phi^a</math></b>	<b><math>\Delta\psi^a</math></b>	<b><math>\Delta\chi1^a</math></b>	<b><math>\Delta\chi2^b</math></b>	<b>F<sup>c</sup></b>
<b>1EA5</b>	<b>-64.4</b>	<b>137.3</b>	<b>167.8</b>	<b>79</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
1QID	-65.8	144.3	167	78.1	-1.4	7	-0.8	-0.9	1
1QIE	-64.6	145.4	168.8	77	-0.2	8.1	1	-2	1
1QIF	-66.7	143.2	170.9	74.9	-2.3	5.9	3.1	-4.1	1
1QIG	-68.9	141.6	170.9	76.9	-4.5	4.3	3.1	-2.1	1
1QIH	-71.7	139.8	171.3	78.5	-7.3	2.5	3.5	-0.5	1
1QII	-72.7	143.4	173.7	79	-8.3	6.1	5.9	0	1
1QIJ	-77.3	137.7	172.1	80.5	-12.9	0.4	4.3	1.5	1
1QIK	-80.7	139	171.1	83.2	-16.3	1.7	3.3	4.2	1
1QIM	-79.8	134.1	168.9	83.7	-15.4	-3.2	1.1	4.7	1
1W75	-49.5	137.7	173.6	83.3	14.9	0.4	5.8	4.3	1
2J4F	-69.4	108.4	169.5	73.4	-5	-28.9	1.7	-5.6	1
1AMN	-79.1	120.1	170.5	-82.4	-14.7	-17.2	2.7	18.6	1
2ACE	-70.2	116.8	174.9	73.9	-5.8	-20.5	7.1	-5.1	1
2C4H	-64.7	142.5	170.6	79.5	-0.3	5.2	2.8	0.5	1
2C58	-61.9	145.4	168.1	79.1	2.5	8.1	0.3	0.1	1
2C5F	-68	139.7	164.5	84.6	-3.6	2.4	-3.3	5.6	1
2C5G	-62.8	141.1	169	82.2	1.6	3.8	1.2	3.2	1
1CFJ	-67.2	143	168.2	84.8	-2.8	5.7	0.4	5.8	1
1SOM	-58.5	140.4	172.7	81	5.9	3.1	4.9	2	1
1VXO	-58.3	146.1	173.7	82.4	6.1	8.8	5.9	3.4	1
1VXR	-59.5	138.2	174.8	75.8	4.9	0.9	7	-3.2	1
2BAG	-55.8	148.2	171.5	81.4	8.6	10.9	3.7	2.4	1
2DPF	-65.9	137.2	168.5	76.3	-1.5	-0.1	0.7	-2.7	1
1ACJ	-81.4	124	165.6	74.9	-17	-13.3	-2.2	-4.1	1
1AX9	-59.4	125.4	171.4	80.7	5	-11.9	3.6	1.7	1
1DX6	-68.2	130.7	179.7	79	-3.8	-6.6	11.9	0	1

1E 66	-59.6	139.2	169.1	86	4.8	1.9	1.3	7	1
1GPK	-63.2	138	173.1	77.2	1.2	0.7	5.3	-1.8	1
1GPN	-60.3	132	172	77.9	4.1	-5.3	4.2	-1.1	1
1GQR	-67.9	132.1	164.8	86.8	-3.5	-5.2	-3	7.8	1
1GQS	-66.6	116.5	168.5	90.8	-2.2	-20.8	0.7	11.8	1
1HBJ	-59.3	135	172.6	80.2	5.1	-2.3	4.8	1.2	1
1QTI	-68.5	127.2	166.1	94.4	-4.1	-10.1	-1.7	15.4	1
1VOT	-64.2	128.2	174.3	72.4	0.2	-9.1	6.5	-6.6	1
1W6R	-65.8	126.1	177.6	83.1	-1.4	-11.2	9.8	4.1	1
2ACK	-59.3	128.5	168.5	76.2	5.1	-8.8	0.7	-2.8	1
1FSS	-82.5	138.1	162.2	80.2	-18.1	0.8	-5.6	1.2	1
1ACL	-73.2	125.5	173.7	-87.7	-8.8	-11.8	5.9	13.3	1
1E3Q	-70.2	131.1	177.5	78.4	-5.8	-6.2	9.7	-0.6	1
1EVE	-71.5	137.5	167	85.6	-7.1	0.2	-0.8	6.6	1
1H22	-60.3	141.1	174.8	82.9	4.1	3.8	7	3.9	1
1H23	-60.1	140.7	175.1	83	4.3	3.4	7.3	4	1
1IJB	-67.2	138.1	167.1	83.4	-2.8	0.8	-0.7	4.4	1
1OCE	-72.4	121.1	172.2	-81	-8	-16.2	4.4	20	1
1ODC	-62	142.5	176.6	79.6	2.4	5.2	8.8	0.6	1
1U65	-75.2	133	162.9	76.4	-10.8	-4.3	-4.9	-2.6	1
1UT6	-69.3	139	173.2	87.4	-4.9	1.7	5.4	8.4	1
1W4L	-64.2	130.1	-179	81.2	0.2	-7.2	13.2	2.2	1
1W76	-59.5	134.8	175.8	72.8	4.9	-2.5	8	-6.2	1
1ZGB	-64.3	139.5	171.7	90.2	0.1	2.2	3.9	11.2	1
1ZGC	-70.9	123.7	-177.7	86.7	-6.5	-13.6	14.5	7.7	1
2CEK	-67.6	142.5	173.8	82.6	-3.2	5.2	6	3.6	1
2CKM	-62.8	142.1	-175.1	74.6	1.6	4.8	17.1	-4.4	1
2CMF	-65.2	131.9	176.3	84	-0.8	-5.4	8.5	5	1
<b>1JO6</b>	<b>-65.1</b>	<b>139.7</b>	<b>168.2</b>	<b>-86</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>A</b>

1MAA	-64.1	150.3	167.5	-75.3	1	10.6	-0.7	10.7	A
2H9Y	-59.8	132.6	172.2	-96.8	5.3	-7.1	4	-10.8	A
2HA0	-58.8	131.8	174.2	-96	6.3	-7.9	6	-10	A
2HA2	-53.9	138.3	179.3	-92.4	11.2	-1.4	11.1	-6.4	A
2HA3	-63.9	135.2	175.6	-93.1	1.2	-4.5	7.4	-7.1	A
2HA4	-53.8	136	177.9	-97.6	11.3	-3.7	9.7	-11.6	A
2HA5	-56.8	137.6	177.9	-96.6	8.3	-2.1	9.7	-10.6	A
2HA6	-58.2	134.7	179.7	90.4	6.9	-5	11.5	-3.6	A
2HA7	-62.6	132	177.1	-99	2.5	-7.7	8.9	-13	A
2C0P	-60.5	132.9	174.6	-92.7	4.6	-6.8	6.4	-6.7	A
2C0Q	-59.2	130.6	179.8	-105.8	5.9	-9.1	11.6	-19.8	A
2JGE	-59.2	135.8	173.3	-96.9	5.9	-3.9	5.1	-10.9	A
2JGF	-54.3	133.8	-179.2	-102.3	10.8	-5.9	12.6	-16.3	A
2JGG	-58.8	124.2	178.5	-97.8	6.3	-15.5	10.3	-11.8	A
2JGH	-61	127.8	170.8	-86.9	4.1	-11.9	2.6	-0.9	A
2JGI	-63.8	135	167.9	-95.7	1.3	-4.7	-0.3	-9.7	A
2JGJ	-58.2	142.9	175.7	-97	6.9	3.2	7.5	-11	A
2JGK	-59.8	131.8	175.3	-99.9	5.3	-7.9	7.1	-13.9	A
2JGL	-55	139.9	175	-98.8	10.1	0.2	6.8	-12.8	A
2JGM	-52.4	138.5	178.5	-99.4	12.7	-1.2	10.3	-13.4	A
1J07	-66.2	138.8	168.3	-91	-1.1	-0.9	0.1	-5	A
1KU6	-70	140.5	170.3	76.7	-4.9	0.8	2.1	-17.3	A
1MAH	-94.7	141.7	162	87.5	-29.6	2	-6.2	-6.5	A
1N5M	-65.7	137.6	174.5	-89.7	-0.6	-2.1	6.3	-3.7	A
1N5R	-68.5	139.3	166.7	-91.9	-3.4	-0.4	-1.5	-5.9	A
1Q83	-69.3	131.8	172.3	-97.4	-4.2	-7.9	4.1	-11.4	A
1Q84	-65.6	129.9	-176.2	-102.5	-0.5	-9.8	15.6	-16.5	A
2GYU	-63.1	138.5	179	-95.9	2	-1.2	10.8	-9.9	A
2GYV	-64.1	131.4	165.8	-95.8	1	-8.3	-2.4	-9.8	A

2GYW	-65.7	134.4	177.6	-107.4	-0.6	-5.3	9.4	-21.4	A
1B41	-75.1	143.8	157.1	78.3	-10	4.1	-11.1	-15.7	A
1F8U	-80.4	146.5	154.5	71.9	-15.3	6.8	-13.7	-22.1	A
<b>3d</b> /hAChE(Bind_1)	-82.9	137.5	-169.3	70.5	-17.8	-2.2	22.5	-23.5	A
<b>3d</b> /hAChE(Bind_2)	-69.7	117.3	-177.5	104.8	-4.6	-22.4	14.3	10.8	A
<b>3f</b> /hAChE(Bind_2)	-148	148.1	-140.1	81	-82.9	8.4	51.7	-13	C
<b>3f</b> /hAChE(Bind_1)	-82.4	127.4	-173.1	77.7	-17.3	-12.3	18.7	-16.3	A
<b>3j</b> /hAChE	-102.7	135.4	-170.7	77.3	-37.6	-4.3	21.1	-16.7	B
<b>3m</b> /hAChE	-70.1	142.6	-173.6	74	-5	2.9	18.2	-20	A

**Tabella 3 B:** Valori degli angoli diedri calcolati per il residuo D74 dell'AChE.

Codice PDB	phi	psi	chi1	chi2	$\Delta\phi^a$	$\Delta\psi^a$	$\Delta\chi1^a$	$\Delta\chi2^b$	F <sup>c</sup>
<b>1EA5</b>	<b>-71.7</b>	<b>117.1</b>	<b>174.4</b>	<b>26.6</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
1QID	-70.1	114.6	176.3	24	1.6	-2.5	1.9	-2.6	1
1QIE	-67.3	121.2	174.3	27.3	4.4	4.1	-0.1	0.7	1
1QIF	-68.5	119.4	171.7	32.5	3.2	2.3	-2.7	5.9	1
1QIG	-72.3	124.8	174.6	31.9	-0.6	7.7	0.2	5.3	1
1QIH	-69.7	124.5	170.9	33.7	2	7.4	-3.5	7.1	1
1QII	-68.8	127.2	172	29.4	2.9	10.1	-2.4	2.8	1
1QIJ	-76.6	127	176.1	26.1	-4.9	9.9	1.7	-0.5	1
1QIK	-78.5	127.7	172.2	39.8	-6.8	10.6	-2.2	13.2	1
1QIM	-81.7	129.9	171.8	34.6	-10	12.8	-2.6	8	1
1W75	-74.5	127.2	167.3	31.3	-2.8	10.1	-7.1	4.7	1
2JF4	-120.2	96.7	167.8	-124.4	-48.5	-20.4	-6.6	29	2
1AMN	-81.1	110.3	-177.4	53.8	-9.4	-6.8	8.2	27.2	1
2ACE	-90.4	122.4	179.8	32.2	-18.7	5.3	5.4	5.6	1
2C4H	-73.8	114.2	175	-178	-2.1	-2.9	0.6	-24.6	1
2C58	-71.4	117.2	-176	-176.8	0.3	0.1	9.6	-23.4	1
2C5F	-72.7	112	175.4	30	-1	-5.1	1	3.4	1

2C5G	-71.9	112.4	-177.7	177	-0.2	-4.7	7.9	-29.6	1
1CFJ	-65.6	113.1	-171	0.1	6.1	-4	14.6	-26.5	1
1SOM	-70.9	117	180	-7.4	0.8	-0.1	5.6	-34	3
1VX0	-70.2	114.6	-176.8	-4.4	1.5	-2.5	8.8	-31	3
1VXR	-76.9	115	-179.9	5.2	-5.2	-2.1	5.7	-21.4	1
2BAG	-67	123	-174.4	-7.5	4.7	5.9	11.2	-34.1	3
2DPF	-71.3	122	177.2	10.1	0.4	4.9	2.8	-16.5	1
1OCE	-78.9	140.3	158.3	-62.4	-7.2	23.2	-16.1	-89	4
1ACJ	-92.4	118.4	177.9	15.1	-20.7	1.3	3.5	-11.5	1
1AX9	-84.3	109.7	-175.9	17.5	-12.6	-7.4	9.7	-9.1	1
1DX6	-69.9	119.2	-178.2	4.3	1.8	2.1	7.4	-22.3	1
1E 66	-77.7	115.6	178.5	5.5	-6	-1.5	4.1	-21.1	1
1GPK	-71.4	112	179.4	5.4	0.3	-5.1	5	-21.2	1
1GPN	-74.7	111.3	179.3	18.7	-3	-5.8	4.9	-7.9	1
1GQR	-69.7	121.9	179.5	18.6	2	4.8	5.1	-8	1
1GQS	-85.8	119.2	174.7	40.7	-14.1	2.1	0.3	14.1	1
1HBJ	-70.4	126.9	-175.7	13.2	1.3	9.8	9.9	-13.4	1
1QTI	-76	125.1	-177.5	16.9	-4.3	8	8.1	-9.7	1
1VOT	-81.2	111.7	178.6	11.2	-9.5	-5.4	4.2	-15.4	1
1W6R	-72.5	118.1	-179.5	8.4	-0.8	1	6.1	-18.2	1
2ACK	-74.8	111.1	179.3	16.6	-3.1	-6	4.9	-10	1
1FSS	-89.1	95.6	-134.8	-48.1	-17.4	-21.5	50.8	-74.7	5
1ACL	-87.9	121.6	179.8	65.3	-16.2	4.5	5.4	38.7	3
1E3Q	-70.8	111.8	174.1	27.2	0.9	-5.3	-0.3	0.6	1
1EVE	-69.2	118.2	-169.7	-48.7	2.5	1.1	15.9	-75.3	4
1H22	-72.9	119.1	176.2	-3.6	-1.2	2	1.8	-30.2	3
1H23	-73.7	120.1	-179.6	2.6	-2	3	6	-24	1
1JJB	-70.5	118.7	171.2	27.6	1.2	1.6	-3.2	1	1
1ODC	-70.1	120.4	-174.1	-16.5	1.6	3.3	11.5	-43.1	3

1U65	-76.5	119.2	167.7	26	-4.8	2.1	-6.7	-0.6	1
1UT6	-66.9	126.9	-178.7	10.5	4.8	9.8	6.9	-16.1	1
1W4L	-66.5	119.3	178.8	8.3	5.2	2.2	4.4	-18.3	1
1W76	-84.9	131.4	160.7	54.1	-13.2	14.3	-13.7	27.5	1
1ZGB	-72.5	120.9	-175.1	4.6	-0.8	3.8	10.5	-22	1
1ZGC	-75.4	119.4	161.1	35.8	-3.7	2.3	-13.3	9.2	1
2CEK	-69.6	118.7	176.5	16	2.1	1.6	2.1	-10.6	1
2CKM	-66.9	123.6	174.4	32.5	4.8	6.5	0	5.9	1
2CMF	-72.2	123.2	165.2	41.9	-0.5	6.1	-9.2	15.3	1
<b>1J06</b>	<b>-66.7</b>	<b>130.1</b>	<b>-176.6</b>	<b>98.3</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>A</b>
1MAA	-73.9	125.5	-158.9	82.8	-7.2	-4.6	17.7	-15.5	A
2H9Y	-59.8	132.6	172.2	-96.8	6.9	2.5	-11.2	-15.1	A
2HA0	-68.6	131.3	-158.2	93.3	-1.9	1.2	18.4	-5	A
2HA2	-63.5	129	-162.7	108.2	3.2	-1.1	13.9	9.9	A
2HA3	-68.3	128.9	-161.8	103	-1.6	-1.2	14.8	4.7	A
2HA4	-63.8	127.4	-163	99.4	2.9	-2.7	13.6	1.1	A
2HA5	-63.4	130.8	-170.7	97.1	3.3	0.7	5.9	-1.2	A
2HA6	-73.6	130.1	-159.9	-78.1	-6.9	0	16.7	3.6	A
2HA7	-69.8	134	-155.8	93.4	-3.1	3.9	20.8	-4.9	A
2C0P	-65.5	120.7	177.4	15.9	1.2	-9.4	-6	-82.4	B
2C0Q	-71.5	137	175.7	59.3	-4.8	6.9	-7.7	-39	C
2JGE	-63.6	132	-175.7	123.1	3.1	1.9	0.9	24.8	A
2JGF	-65.2	126.3	-174.1	-55.1	1.5	-3.8	2.5	26.6	A
2JGG	-69.9	134	178.4	68.6	-3.2	3.9	-5	-29.7	A
2JGH	-66.7	130.1	163.5	46.3	0	0	-19.9	-52	C
2JGI	-70.7	138.3	-179	58.9	-4	8.2	-2.4	-39.4	C
2JGJ	-74.4	126.3	178.9	-70.6	-7.7	-3.8	-4.5	11.1	A
2JGK	-72.3	131.2	-173.7	43.9	-5.6	1.1	2.9	-54.4	C
2JGL	-67.8	134	-171.2	69.8	-1.1	3.9	5.4	-28.5	A



2JGM	-63.7	127.9	-178.2	60.9	3	-2.2	-1.6	-37.4	C
1J07	-70.9	131.8	-171.1	72.9	-4.2	1.7	5.5	-25.4	A
1KU6	-76.6	105.2	-173.2	-38.3	-9.9	-24.9	3.4	43.4	C
1MAH	-78.7	126.7	-174.5	22.8	-12	-3.4	2.1	-75.5	B
1N5M	-76	129.6	-172.9	73.4	-9.3	-0.5	3.7	-24.9	A
1N5R	-69.6	128.2	-176	93.7	-2.9	-1.9	0.6	-4.6	A
1Q83	-70.8	121.6	-178.8	172.9	-4.1	-8.5	-2.2	74.6	B
1Q84	-69.3	126.5	178.9	12.4	-2.6	-3.6	-4.5	-85.9	B
2GYU	-64.3	122.9	-73.6	-68	2.4	-7.2	103	13.7	D
2GYV	-51.8	119.8	-167.6	-10.7	14.9	-10.3	9	71	B
2GYW	-64.9	140.8	-164.5	98	1.8	10.7	12.1	-0.3	A
1B41	-67.3	108.1	172.5	27.2	-0.6	-22	-10.9	-71.1	B
1F8U	-71.4	98.9	-179.5	42.1	-4.7	-31.2	-2.9	-56.2	E
<b>3d/hAChE(Bind_1)</b>	-95.2	70.3	-167.2	62.9	-28.5	-59.8	9.4	-35.4	E
<b>3d/hAChE(Bind_2)</b>	-71.4	88.5	-158.5	45.4	-4.7	-41.6	18.1	-52.9	E
<b>3f/hAChE(Bind_1)</b>	-77.5	73.4	-159.3	-139.9	-10.8	-56.7	17.3	-58.2	E
<b>3f/hAChE(Bind_2)</b>	-84.9	86.4	-175.9	76.7	-18.2	-43.7	0.7	-21.6	H
<b>3j/hAChE</b>	-78.9	124.2	-160.2	78.2	-12.2	-5.9	16.4	-20.1	A
<b>3m/hAChE</b>	-68.9	126.3	-155.3	51.8	-2.2	-3.8	21.3	-46.5	C

**Tabella 3 C:** Valori degli angoli diedri calcolati per il residuo W86 dell'AChE.

Codice PDB	phi	psi	chi1	chi2	$\Delta\phi^a$	$\Delta\psi^a$	$\Delta\chi1^a$	$\Delta\chi2^a$	F <sup>c</sup>
<b>1EA5</b>	<b>-102.7</b>	<b>-15.1</b>	<b>-57.3</b>	<b>104.9</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
1QID	-101.1	-17.3	-55.9	104.1	1.6	-2.2	1.4	-0.8	1
1QIE	-100.3	-19.3	-57.6	107.2	2.4	-4.2	-0.3	2.3	1
1QIF	-101.9	-17.6	-56.3	105.7	0.8	-2.5	1	0.8	1
1QIG	-101.4	-16.4	-58.2	107.2	1.3	-1.3	-0.9	2.3	1
1QIH	-104.6	-16.6	-59	107.8	-1.9	-1.5	-1.7	2.9	1
1QII	-109.2	-17.3	-58.7	106	-6.5	-2.2	-1.4	1.1	1

1QIJ	-109	-19.2	-57.9	106.5	-6.3	-4.1	-0.6	1.6	1
1QIK	-114.9	-19.6	-58	108.5	-12.2	-4.5	-0.7	3.6	1
1QIM	-117.6	-22.4	-57	107.5	-14.9	-7.3	0.3	2.6	1
1W75	-107.1	-16.8	-56.5	106.3	-4.4	-1.7	0.8	1.4	1
2JF4	-102.9	-7.6	-51.9	106.8	-0.2	7.5	5.4	1.9	1
1AMN	-88.5	3.1	-48.8	105.8	14.2	18.2	8.5	0.9	1
2ACE	-104.1	-4.8	-56.8	106.2	-1.4	10.3	0.5	1.3	1
2C4H	-101.8	-16	-57.7	107.2	0.9	-0.9	-0.4	2.3	1
2C58	-102.3	-14.4	-57.7	103.5	0.4	0.7	-0.4	-1.4	1
2C5F	-100.5	-14.8	-57.9	108.2	2.2	0.3	-0.6	3.3	1
2C5G	-100.3	-12.4	-56.5	100	2.4	2.7	0.8	-4.9	1
2H9Y	-99.3	-9.9	-52.7	109.3	3.4	5.2	4.6	4.4	1
1CFJ	-101.1	-14.8	-57.5	106.3	1.6	0.3	-0.2	1.4	1
1SOM	-101.5	-16.4	-58.2	109.1	1.2	-1.3	-0.9	4.2	1
1VX0	-90.8	-13.4	-52.3	104.9	11.9	1.7	5	0	1
1VXR	-114.1	-18.1	-65	106	-11.4	-3	-7.7	1.1	1
2BAG	-92.7	-19.5	-60.1	106.2	10	-4.4	-2.8	1.3	1
2DPF	-107	-11.9	-52.7	104.3	-4.3	3.2	4.6	-0.6	1
1ACJ	-100.3	5.8	-53.4	98.2	2.4	20.9	3.9	-6.7	1
1AX9	-100.8	-13.7	-52.9	99.7	1.9	1.4	4.4	-5.2	1
1DX6	-98.1	-17.4	-55.4	104.9	4.6	-2.3	1.9	0	1
1e 66	-106.3	-17.8	-60.3	102.6	-3.6	-2.7	-3	-2.3	1
1GPK	-103.4	-16.3	-60.8	100.4	-0.7	-1.2	-3.5	-4.5	1
1GPN	-105.3	-16.9	-57.7	97	-2.6	-1.8	-0.4	-7.9	1
1GQR	-104.6	-15.6	-56	112.1	-1.9	-0.5	1.3	7.2	1
1GQS	-109.2	-21.2	-51.3	98.5	-6.5	-6.1	6	-6.4	1
1HBJ	-99.3	-17.8	-56.9	96.2	3.4	-2.7	0.4	-8.7	1
1QTI	-110.7	-7.1	-54.8	100.1	-8	8	2.5	-4.8	1
1VOT	-97	-5.9	-54.8	102.3	5.7	9.2	2.5	-2.6	1

1W6R	-101.1	-16.2	-54	108.7	1.6	-1.1	3.3	3.8	1
2ACK	-92.3	-11.1	-60	110.9	10.4	4	-2.7	6	1
1FSS	-104.2	-16.7	-55.2	95.7	-1.5	-1.6	2.1	-9.2	1
1ACL	-99	6.7	-40.2	96.9	3.7	21.8	17.1	-8	1
1E3Q	-103.9	-14.5	-46.4	102	-1.2	0.6	10.9	-2.9	1
1EVE	-101.4	-13.6	-56	107.9	1.3	1.5	1.3	3	1
1H22	-106.3	-10.2	-56.9	107.5	-3.6	4.9	0.4	2.6	1
1H23	-103.6	-9.5	-56.3	107.7	-0.9	5.6	1	2.8	1
1JJB	-105.7	-16.7	-56.5	106.7	-3	-1.6	0.8	1.8	1
1OCE	-113.9	-9.7	-52	99.1	-11.2	5.4	5.3	-5.8	1
1ODC	-98.5	-20.1	-56.4	109.8	4.2	-5	0.9	4.9	1
1U65	-114.2	-14.2	-52	99.2	-11.5	0.9	5.3	-5.7	1
1UT6	-94.7	-20.4	-56.6	110.9	8	-5.3	0.7	6	1
1W4L	-100.2	-16.2	-55.5	109.4	2.5	-1.1	1.8	4.5	1
1W76	-108.1	-15.4	-61.6	109	-5.4	-0.3	-4.3	4.1	1
1ZGB	-101.7	-17.2	-56.5	102.8	1	-2.1	0.8	-2.1	1
1ZGC	-103	-12.6	-54.3	99.7	-0.3	2.5	3	-5.2	1
2CEK	-101	-16.6	-56.3	110.6	1.7	-1.5	1	5.7	1
2CKM	-101.5	-19	-54	105.8	1.2	-3.9	3.3	0.9	1
2CMF	-99	-24.1	-55.5	100.1	3.7	-9	1.8	-4.8	1
<b>1J06</b>	<b>-98.5</b>	<b>-9.2</b>	<b>-51.8</b>	<b>104.3</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>A</b>
1MAA	-96.2	-17.9	-58.4	112.7	2.3	-8.7	-6.6	8.4	A
2HA0	-101.9	-8.9	-52.9	107.2	-3.4	0.3	-1.1	2.9	A
2HA2	-102.8	-8.1	-48.6	100.4	-4.3	1.1	3.2	-3.9	A
2HA3	-96.3	-10.8	-50.6	111.5	2.2	-1.6	1.2	7.2	A
2HA4	-98.1	-13.8	-54.6	110.8	0.4	-4.6	-2.8	6.5	A
2HA5	-103	-4.8	-51.2	104.1	-4.5	4.4	0.6	-0.2	A
2HA6	-98.6	-9.1	-52.7	107.7	-0.1	0.1	-0.9	3.4	A
2HA7	-104.1	-11.5	-53.2	108.4	-5.6	-2.3	-1.4	4.1	A

2C0P	-97.6	-5.1	-53.5	111.4	0.9	4.1	-1.7	7.1	A
2C0Q	-96.4	-3.8	-54.5	111.7	2.1	5.4	-2.7	7.4	A
2JGE	-95.4	-15.1	-56	114.1	3.1	-5.9	-4.2	9.8	A
2JGF	-98.3	-9.8	-57.7	117.2	0.2	-0.6	-5.9	12.9	A
2JGG	-96.2	-16.2	-53.4	104.3	2.3	-7	-1.6	0	A
2JGH	-94.8	-5.9	-49.8	105.5	3.7	3.3	2	1.2	A
2JGI	-92	-12	-48.4	105.8	6.5	-2.8	3.4	1.5	A
2JGJ	-94.2	-5.4	-54.5	111.7	4.3	3.8	-2.7	7.4	A
2JGK	-100.1	-13.1	-52.7	109.5	-1.6	-3.9	-0.9	5.2	A
2JGL	-97	-9.2	-51.7	107.7	1.5	0	0.1	3.4	A
2JGM	-107.4	-18.3	-55.1	106.2	-8.9	-9.1	-3.3	1.9	A
1J07	-103.5	-9.6	-50.5	103.2	-5	-0.4	1.3	-1.1	A
1KU6	-108.7	-9.9	-52.2	101.4	-10.2	-0.7	-0.4	-2.9	A
1MAH	-100.2	-10.3	-50.7	103	-1.7	-1.1	1.1	-1.3	A
1N5M	-73.6	-32.4	-65.1	-69.8	24.9	-23.2	-13.3	-174.1	B
1N5R	-100.1	-7.6	-49.7	103	-1.6	1.6	2.1	-1.3	A
1Q83	-96.8	-13.9	-50.6	104.4	1.7	-4.7	1.2	0.1	A
1Q84	-95.7	-14.7	-52.2	103.3	2.8	-5.5	-0.4	-1	A
2GYU	-102.6	-13.9	-52.5	108.3	-4.1	-4.7	-0.7	4	A
2GYV	-104.5	-7.1	-56.6	106.2	-6	2.1	-4.8	1.9	A
2GYW	-95	-9.5	-53.4	106.7	3.5	-0.3	-1.6	2.4	A
1B41	-108.1	-10	-53.3	104.1	-9.6	-0.8	-1.5	-0.2	A
1F8U	-106	-14.7	-49.1	97.9	-7.5	-5.5	2.7	-6.4	A
<b>3d/hAChE(Bind_1)</b>	-69.7	-21.9	-61.6	104.9	28.8	-12.7	-9.8	0.6	A
<b>3d/hAChE(Bind_2)</b>	-75.3	-26.3	-48.7	103.7	23.2	-17.1	3.1	-0.6	A
<b>3f/hAChE(Bind_1)</b>	-68.1	-15.2	-85.5	79.6	30.4	-6	-33.7	-24.7	C
<b>3f/hAChE(Bind_2)</b>	-74.2	-31.1	-59.1	100.8	24.3	-21.9	-7.3	-3.5	A
<b>3j/hAChE</b>	-68.8	-29.9	-58	101.2	29.7	-20.7	-6.2	-3.1	A
<b>3m/hAChE</b>	-79.1	-12.8	-60.3	112.3	19.4	-3.6	-8.5	8	A

---

**Tabella 3 D:** Valori di  $\Delta$ angolo calcolati per G120-G122 dell'ACHe.

Codice PDB	$\Delta\phi^a$	$\Delta\psi^a$	$\Delta\phi^a$	$\Delta\psi^a$	$\Delta\phi^a$	$\Delta\psi^a$	F <sup>c</sup>
<b>1EA5</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
1QID	3.9	2.6	-2.8	-2.3	-0.4	2.6	1
1QIE	3.6	2.9	-3.9	-1.7	0.1	1.5	1
1QIF	4	2.1	-2.1	-4.2	2.2	-0.5	1
1QIG	4.7	-0.7	-0.8	-4.5	4.7	-2.8	1
1QIH	2.1	-6.2	6.4	-4.2	3.7	0.4	1
1QII	1.7	-4.1	7.1	-7.2	5.3	-1.9	1
1QIJ	-0.5	-8.2	10.1	-3.6	6.3	-0.9	1
1QIK	-5.9	-5.3	12.5	-13.2	17.8	-6.3	1
1QIM	-4.4	-10.1	17.6	-8.5	9.6	0	1
1W75	5.4	4.3	-12.9	-5.6	13.3	-3.4	1
2J4F	9.1	16.9	-35.9	13.3	-25.3	14.3	2
1AMN	-2.9	-1.6	5.5	4.9	-1.3	-2.3	1
2ACE	7.9	-1.1	-2.5	-0.8	0.1	-4.9	1
2C4H	5.9	3.5	-4.9	-3.2	0.7	1.9	1
2C58	-1.2	0.4	-6.1	2.1	-1.9	2.1	1
2C5F	3.2	-1.5	-1.4	0.7	-1.4	-2.2	1
2C5G	0	2.5	-3	-2	1.8	-1.4	1
1CFJ	13	-6.2	-0.5	-10	4.4	-8.3	1
1SOM	6.3	-2.3	-2.4	-1.4	0.6	-0.5	1
1VX0	6	-5.1	-0.6	0.3	-2.1	0.6	1
1VXR	11.8	-3.2	1	-6.8	3.9	0.5	1
2BAG	2.7	-5.2	2.9	-0.5	-2.1	1.5	1
2DPF	7.1	1.5	-2.1	-6.9	0.8	0.9	1
1OCE	4.7	-6.5	17.8	-17.2	9.1	-2.5	1
1ACJ	3.4	-6.3	3.4	-1.8	-3.8	3	1
1AX9	0.9	-4.4	0.1	2.8	-12.5	5.5	1

1DX6	9.1	-3.6	1.1	3.7	-4.2	1.3	1
1E 66	3	-7.2	4	6.2	-6.3	1.5	1
1GPK	-63.1	-111.7	129.4	50.6	-7.6	3.9	3
1GPN	-39.1	-142.2	149.1	34.7	-4.4	4.5	4
1GQR	5.2	2.6	-6.9	-1.9	0.2	-0.5	1
1GQS	1.8	-1	-1.3	1.4	-2.1	2.5	1
1HBJ	8.7	-0.5	-2.2	-2.4	-0.2	-1.7	1
1QTI	6.6	8.5	-10	3.9	0.2	-4.8	1
1VOT	-37.5	-134.7	142.2	46.7	-10.7	1.3	4
1W6R	7.1	-1.4	0.8	0.9	-1.2	0.8	1
2ACK	10.6	-2.2	-2.1	6.9	0.8	-6.8	1
1FSS	-4.5	-18.2	19.5	3.3	0.4	-2.2	1
1ACL	-9.6	-5.1	9.8	21.4	-7.6	-8.7	1
1E3Q	-63.4	-44.4	61.9	45.8	2.4	-9.7	5
1EVE	4.3	2.9	-8.9	-1.8	0.1	1	1
1H22	-43.9	-152.3	151.2	41	-0.1	0.1	6
1H23	-53.4	-139.7	145.5	46	-5.2	4.9	4
1JJB	2.2	-1.7	0.1	-1.2	1.7	-0.7	1
1ODC	10.9	1.3	-9.5	0.2	0.1	-1.5	1
1U65	9.6	2.1	-4.1	-1.8	0.6	-3.2	1
1UT6	6.8	-0.4	-8.9	5.3	-5.7	-2.2	1
1W4L	5.7	0.3	1.7	-1	2.3	-1.8	1
1W76	-3.6	8.5	-5.3	0.3	3.2	1	1
1ZGB	5	3.2	-7.2	4.2	-4.2	-0.4	1
1ZGC	10	2.7	-11.8	0.2	9.6	0.7	1
2CEK	5.1	3.1	-5.8	2.6	-3.5	0.2	1
2CKM	7.5	1.7	-7.7	-0.8	3	-2	1
2CMF	162.4	-175.3	-2	2.7	-3	-7.5	7
<b>1J06</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>A</b>

1MAA	-20.1	-30.3	36.8	14.9	2	-3.5	B
2H9Y	-5.9	8.2	-9.4	3.2	6.5	-2.8	A
2HA0	-0.9	4.2	-11.8	1.6	9.4	-3.8	A
2HA2	-8.6	4.1	-12.7	2.9	20.6	-13.5	A
2HA3	-5.2	3.3	-9.2	-2.7	8.7	-3.6	A
2HA4	-2	0.9	-8.2	2.8	8.5	-9	A
2HA5	-5.1	4.6	-9.5	-2.1	12.3	-3.3	A
2HA6	-6.8	-0.4	-2.3	2.9	13.9	-7.1	A
2HA7	-0.1	0.7	-5.8	-2.3	6.7	-6.7	A
2C0P	7.5	3	-3.2	-4.1	7.6	-8.4	A
2C0Q	2.3	3.6	-2.8	-8.9	7.8	-5.4	A
2JGE	3.3	-1.1	0.7	-4.3	-3	5	A
2JGF	7.5	5	-6.6	-5	7.8	-5.9	A
2JGG	-1.3	-0.1	-0.5	-3.3	8	-7.6	A
2JGH	2.6	4.9	-4.8	-8.5	9.9	-13.4	A
2JGI	-2.4	9	-9	2.6	-3.8	-1.1	A
2JGJ	-0.2	6.2	-6.8	2.4	12.8	-9.8	A
2JGK	-9.5	8.4	-3.4	-2.3	-3.8	3.9	A
2JGL	0.8	-1.5	-1.4	0.6	8.1	-8.9	A
2JGM	-0.3	4.4	-3.2	0.7	-12.1	7.2	A
1J07	-1.7	0.8	-0.7	3.5	-4.8	2.1	A
1KU6	1.3	6.8	-6.5	4.8	-3.4	-2.6	A
1MAH	-2	-15.7	21.1	4.1	-12	11.3	A
1N5M	-1.8	2.2	-4.1	3	0.6	0.1	A
1N5R	-1.9	1	-0.9	2.4	-2.8	2.6	A
1Q83	1.1	5.4	-7	0.2	5	2.4	A
1Q84	-1.1	7.9	-11.8	-0.1	6.4	-0.2	A
2GYU	-1.3	8.3	-14	1.9	11.1	-5.2	A
2GYV	-3.7	7.8	-12.9	-5.8	8.7	-4.6	A

2GYW	10.9	0.4	-4.5	0.6	5.5	-2.4	A
1B41	1.3	7.8	-10	-5.1	-4.8	4.3	A
1F8U	-10	0.5	2.1	2	-3.9	4.3	A
<b>3d</b> /hAChE(Bind_1)	1.9	48.6	-50.5	-95.5	102.2	18.93	D
<b>3d</b> /hAChE(Bind_2)	13.8	13.9	-114.1	-3.9	9.6	0.5	C
<b>3f</b> /hAChE(Bind_1)	-24.3	100.2	-77	-5.2	8.3	1.9	F
<b>3f</b> /hAChE(Bind_2)	-54.3	73.8	-57.4	-83.4	134.5	-3.1	E
<b>3j</b> /hAChE	-2	66.6	-64	-109.8	121.4	21.5	G
<b>3m</b> /hAChE	-7.5	63.4	-60.6	-105.6	114.8	18.7	H

**Tabella 3 E:** Valori degli angoli diedri calcolati per il residuo Y124 dell'AChE.

Codice PDB	phi	psi	chi1	chi2	$\Delta\phi^a$	$\Delta\psi^a$	$\Delta\chi1^a$	$\Delta\chi2^b$	F <sup>c</sup>
<b>1EA5</b>	<b>-114.3</b>	<b>-5.1</b>	<b>70.5</b>	<b>85.1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
1QID	-117.6	-3.7	72.6	79.3	-3.3	1.4	2.1	-5.8	1
1QIE	-118.7	-3.7	71.7	80.7	-4.4	1.4	1.2	-4.4	1
1QIF	-118.2	-3.8	71.4	81.9	-3.9	1.3	0.9	-3.2	1
1QIG	-120.5	-2.4	72.8	82.6	-6.2	2.7	2.3	-2.5	1
1QIH	-123.3	-1.5	72.6	82.7	-9	3.6	2.1	-2.4	1
1QII	-124.1	-1.6	72.5	79.3	-9.8	3.5	2	-5.8	1
1QIJ	-120.7	1.3	73.3	80.2	-6.4	6.4	2.8	-4.9	1
1QIK	-124.7	-1.8	74.5	76.6	-10.4	3.3	4	-8.5	1
1QIM	-126.3	6.2	74.5	76.4	-12	11.3	4	-8.7	1
1W75	-113.3	-1.8	79.6	88.3	1	3.3	9.1	3.2	1
2J4F	-103.6	13.7	73.1	83.9	10.7	18.8	2.6	-1.2	1
1AMN	-104	-12.8	69.4	78.3	10.3	-7.7	-1.1	-6.8	1
2ACE	-98	-11.4	70.3	85	16.3	-6.3	-0.2	-0.1	1
2C4H	-111.8	-7.9	71.3	81.5	2.5	-2.8	0.8	-3.6	1
2C58	-111.1	-7.5	70.4	81.9	3.2	-2.4	-0.1	-3.2	1
2C5F	-114.3	-9.4	70.2	82	0	-4.3	-0.3	-3.1	1



2C5G	-114.4	-4.8	68.9	82.4	-0.1	0.3	-1.6	-2.7	1
1CFJ	-118.7	-3.7	71.1	79.2	-4.4	1.4	0.6	-5.9	1
1SOM	-115.8	-3.7	71.9	86	-1.5	1.4	1.4	0.9	1
1VXO	-115.4	-2.3	73.2	84.7	-1.1	2.8	2.7	-0.4	1
1VXR	-114.4	-7.4	66.5	85.5	-0.1	-2.3	-4	0.4	1
2BAG	-114.1	-4.8	72.7	83.1	0.2	0.3	2.2	-2	1
2DPF	-127.1	-1.3	67.2	82.5	-12.8	3.8	-3.3	-2.6	1
1OCE	-105.3	-11.4	78.1	86.4	9	-6.3	7.6	1.3	1
1ACJ	-108.4	-6.4	65.7	-87.5	5.9	-1.3	-4.8	7.4	1
1AX9	-95.6	-12.2	67.9	86.6	18.7	-7.1	-2.6	1.5	1
1DX6	-116.4	-5.2	73.6	82.8	-2.1	-0.1	3.1	-2.3	1
1E66	-112.4	-10.1	74.1	86.1	1.9	-5	3.6	1	1
1GPK	-116	-8.8	76.8	84.1	-1.7	-3.7	6.3	-1	1
1GPN	-115.8	-8.9	68.6	86	-1.5	-3.8	-1.9	0.9	1
1GQR	-112.6	-7.3	70.5	82.7	1.7	-2.2	0	-2.4	1
1GQS	-129.3	-2.4	73.1	81.8	-15	2.7	2.6	-3.3	1
1HBJ	-113.2	2.7	66	89.1	1.1	7.8	-4.5	4	1
1QTI	-114.3	-10.4	75.2	80.2	0	-5.3	4.7	-4.9	1
1VOT	-108.8	-9.3	68.9	86.5	5.5	-4.2	-1.6	1.4	1
1W6R	-116.4	-4.7	69.7	87.7	-2.1	0.4	-0.8	2.6	1
2ACK	-109.6	-18.5	70	81.6	4.7	-13.4	-0.5	-3.5	1
1FSS	-11.3	-9.5	66.4	-86.9	103	-4.4	-4.1	8	2
1ACL	-118.7	-10.2	66.2	86.1	-4.4	-5.1	-4.3	1	1
1E3Q	-118.9	-12.9	76.4	68.8	-4.6	-7.8	5.9	-16.3	1
1EVE	-111.3	-4.1	73.8	87.7	3	1	3.3	2.6	1
1H22	-116.4	-3.6	70	88.6	-2.1	1.5	-0.5	3.5	1
1H23	-113.4	-6.7	70.8	85.6	0.9	-1.6	0.3	0.5	1
1IJB	-115.3	-4.8	73.6	84	-1	0.3	3.1	-1.1	1
1ODC	-117.1	-5.1	76.5	89.5	-2.8	0	6	4.4	1

1U65	-114.2	-8.6	71.7	83.2	0.1	-3.5	1.2	-1.9	1
1UT6	-116.7	-4.1	75.2	81.5	-2.4	1	4.7	-3.6	1
1W4L	-118.7	-3.2	70.5	83.3	-4.4	1.9	0	-1.8	1
1W76	-117.2	0.5	73.1	79.7	-2.9	5.6	2.6	-5.4	1
1ZGB	-116.7	-4	74.9	86.1	-2.4	1.1	4.4	1	1
1ZGC	-111.3	-16	86.3	85.9	3	-10.9	15.8	0.8	1
2CEK	-115.9	-6.9	73.5	78.9	-1.6	-1.8	3	-6.2	1
2CKM	-117.1	-6.6	71	80.7	-2.8	-1.5	0.5	-4.4	1
2CMF	-117.1	-9.5	57	75.3	-2.8	-4.4	-13.5	-9.8	1
<b>1JO6</b>	<b>-125.6</b>	<b>-1.3</b>	<b>74.8</b>	<b>78.9</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>A</b>
1MAA	-122.9	-9.3	79.6	76	2.7	-8	4.8	-2.9	A
2H9Y	-118.6	-3.9	66.8	86.8	7	-2.6	-8	7.9	A
2HA0	-117.4	-5.8	77.2	86.4	8.2	-4.5	2.4	7.5	A
2HA2	-121.1	-5.1	76	90.7	4.5	-3.8	1.2	11.8	A
2HA3	-118.1	-3.9	74.6	86.5	7.5	-2.6	-0.2	7.6	A
2HA4	-121.9	-5.8	75.3	85.5	3.7	-4.5	0.5	6.6	A
2HA5	-114.8	-5.2	74.9	87.9	10.8	-3.9	0.1	9	A
2HA6	-117.5	-5.6	74.1	-89.8	8.1	-4.3	-0.7	11.3	A
2HA7	-116.4	-5.1	69.8	88	9.2	-3.8	-5	9.1	A
2C0P	-114.6	-8.5	60.2	88.7	11	-7.2	-14.6	9.8	A
2C0Q	-121.5	-5.8	66.4	84	4.1	-4.5	-8.4	5.1	A
2JGE	-117	-9.9	68.3	82.9	8.6	-8.6	-6.5	4	A
2JGF	-122.4	-9.6	69.1	82.2	3.2	-8.3	-5.7	3.3	A
2JGG	-114.6	-10	67.1	86.1	11	-8.7	-7.7	7.2	A
2JGH	-117.8	-7.9	62.7	84.7	7.8	-6.6	-12.1	5.8	A
2JGI	-116	-4.6	66.7	74.8	9.6	-3.3	-8.1	-4.1	A
2JGJ	-118.6	-3.2	74.5	84.6	7	-1.9	-0.3	5.7	A
2JGK	-115.8	-6.4	64.9	79.7	9.8	-5.1	-9.9	0.8	A
2JGL	-122.6	-5.8	71	85.6	3	-4.5	-3.8	6.7	A

2JGM	-113.7	-0.9	64.2	85.5	11.9	0.4	-10.6	6.6	A
1J07	-119.1	-4.4	71.3	82.1	6.5	-3.1	-3.5	3.2	A
1KU6	-121.1	-11	73.1	78.1	4.5	-9.7	-1.7	-0.8	A
1MAH	-135.4	2.3	71.7	82.8	-9.8	3.6	-3.1	3.9	A
1N5M	-120.2	-0.7	74.6	82.6	5.4	0.6	-0.2	3.7	A
1N5R	-122.7	-2.1	71.5	83	2.9	-0.8	-3.3	4.1	A
1Q83	-122.6	-8.7	83.5	91.1	3	-7.4	8.7	12.2	A
1Q84	-120.4	-8.4	86.5	84.5	5.2	-7.1	11.7	5.6	A
2GYU	-117.4	-4.9	73.9	86.6	8.2	-3.6	-0.9	7.7	A
2GYV	-123.1	-2	70.3	79.2	2.5	-0.7	-4.5	0.3	A
2GYW	-119.5	-5.5	71.6	86.6	6.1	-4.2	-3.2	7.7	A
1B41	-118.8	-8.6	71.1	81.5	6.8	-7.3	-3.7	2.6	A
1F8U	-109.3	-6.2	75.1	81.7	16.3	-4.9	0.3	2.8	A
<b>3d/hAChE(Bind_1)</b>	-76	-27.1	94.4	103	49.6	-25.8	19.6	24.1	C
<b>3d/hAChE(Bind_2)</b>	-73.6	-31.6	102.7	112.6	52	-30.3	27.9	33.7	B
<b>3f/hAChE(Bind_1)</b>	-75.3	-25.4	84.4	97.5	50.3	-24.1	9.6	18.6	C
<b>3f/hAChE(Bind_2)</b>	-54.3	-37.2	82.8	93.3	71.3	-35.9	8	14.4	D
<b>3j/hAChE</b>	-88.6	-0.9	169.9	174.9	37	0.4	95.1	-84	E
<b>3m/hAChE</b>	-60.7	-54.9	74.1	103.3	64.9	-53.6	-0.7	24.4	D

**Tabella 3 F:** Valori degli angoli diedri calcolati per il residuo W286 dell'AChE.

<b>Codice PDB</b>	<b>phi</b>	<b>psi</b>	<b>chi1</b>	<b>chi2</b>	<b>Δphi<sup>a</sup></b>	<b>Δpsi<sup>a</sup></b>	<b>Δchi1<sup>a</sup></b>	<b>Δchi2<sup>a</sup></b>	<b>F<sup>c</sup></b>
1EA5	-76.2	-8.5	-62.3	96.7	0	0	0	0	1
1QID	-71.9	-9.1	-60.4	94.8	4.3	-0.6	1.9	-1.9	1
1QIE	-72.3	-9.4	-60	95.3	3.9	-0.9	2.3	-1.4	1
1QIF	-73.2	-9.1	-61	97.4	3	-0.6	1.3	0.7	1
1QIG	-77.2	-9.2	-64.6	95.5	-1	-0.7	-2.3	-1.2	1
1QIH	-76.4	-5.4	-62.3	92.6	-0.2	3.1	0	-4.1	1
1QII	-76.3	-6.4	-62.4	89.9	-0.1	2.1	-0.1	-6.8	1

1QIJ	-74.7	-4.2	-61.7	89	1.5	4.3	0.6	-7.7	1
1QIK	-69.2	-4.1	-65	91.6	7	4.4	-2.7	-5.1	1
1QIM	-68	-8.3	-64.5	92.3	8.2	0.2	-2.2	-4.4	1
1W75	-64.1	-21.7	-55.5	94	12.1	-13.2	6.8	-2.7	1
2JF4	-92.8	-9.7	-69	96	-16.6	-1.2	-6.7	-0.7	1
1AMN	-85	-17.8	-59.4	96.2	-8.8	-9.3	2.9	-0.5	1
2ACE	-81.9	-11.1	-62.7	92.1	-5.7	-2.6	-0.4	-4.6	1
2C4H	-82	-2.6	-56.9	91.1	-5.8	5.9	5.4	-5.6	1
2C58	-75.9	-3.6	-58.3	93.6	0.3	4.9	4	-3.1	1
2C5F	-75.2	-2.5	-57.9	89.7	1	6	4.4	-7	1
2C5G	-77	-7.2	-60.6	94.5	-0.8	1.3	1.7	-2.2	1
1CFJ	-72.4	-13.3	-59.7	94.3	3.8	-4.8	2.6	-2.4	1
1SOM	-70.2	-18.9	-63.1	94.4	6	-10.4	-0.8	-2.3	1
1VX0	-69.4	-20.7	-63.7	92.3	6.8	-12.2	-1.4	-4.4	1
1VXR	-70.6	-16.7	-56.7	91.3	5.6	-8.2	5.6	-5.4	1
2BAG	-75.4	-9.4	-58.6	92.3	0.8	-0.9	3.7	-4.4	1
2DPF	-87.9	-3	-56.2	99.4	-11.7	5.5	6.1	2.7	1
1OCE	-71.6	-5.7	-56	92.9	4.6	2.8	6.3	-3.8	1
1ACJ	-78.3	-3.7	-53.6	31.2	-2.1	4.8	8.7	-65.5	2
1AX9	-86.8	-8.2	-62.6	90.8	-10.6	0.3	-0.3	-5.9	1
1DX6	-72.9	-10.3	-63	94.8	3.3	-1.8	-0.7	-1.9	1
1e 66	-71.6	-13.6	-60.4	90.9	4.6	-5.1	1.9	-5.8	1
1GPK	-73.2	-10.3	-60.2	92.8	3	-1.8	2.1	-3.9	1
1GPN	-75.7	-3	-64	95.9	0.5	5.5	-1.7	-0.8	1
1GQR	-78	-9.9	-56.7	91.3	-1.8	-1.4	5.6	-5.4	1
1GQS	-77.5	-4.9	-61.1	89.9	-1.3	3.6	1.2	-6.8	1
1HBJ	-82.1	-11.1	-61.7	92.9	-5.9	-2.6	0.6	-3.8	1
1QTI	-79.8	-13	-65.5	94.5	-3.6	-4.5	-3.2	-2.2	1
1VOT	-87	-4	-57.7	84.5	-10.8	4.5	4.6	-12.2	1

1W6R	-74.6	-5.9	-65.7	97.4	1.6	2.6	-3.4	0.7	1
2ACK	-74.3	-7.5	-58.5	93.3	1.9	1	3.8	-3.4	1
1FSS	-79	-7	-65.3	99.1	-2.8	1.5	-3	2.4	1
1ACL	-113.5	-1.9	-64.8	91.5	-37.3	6.6	-2.5	-5.2	3
1E3Q	-83.9	-8.9	-62.1	89.7	-7.7	-0.4	0.2	-7	1
1EVE	-73.1	-18.6	-51.7	94.8	3.1	-10.1	10.6	-1.9	1
1H22	-71.1	-15.1	-65.2	100.1	5.1	-6.6	-2.9	3.4	1
1H23	-71.9	-10.7	-62.2	94.8	4.3	-2.2	0.1	-1.9	1
1JJB	-78.3	-6.1	-56.6	89.3	-2.1	2.4	5.7	-7.4	1
1ODC	-72.3	-14.4	-122.4	-119.9	3.9	-5.9	-60.1	143.4	4
1U65	-73.9	-19.8	-61.4	99.8	2.3	-11.3	0.9	3.1	1
1UT6	-75.7	-18.5	-62.1	92.4	0.5	-10	0.2	-4.3	1
1W4L	-73.3	-14.7	-67.2	100.9	2.9	-6.2	-4.9	4.2	1
1W76	-73.2	-23.5	-57.9	94.6	3	-15	4.4	-2.1	1
1ZGB	-71.8	-14.3	-60	97.2	4.4	-5.8	2.3	0.5	1
1ZGC	-81.2	-9.6	-65.6	101.1	-5	-1.1	-3.3	4.4	1
2CEK	-80.8	-4.8	-118.2	-131.9	-4.6	3.7	-55.9	131.4	5
2CKM	-77.9	-13.3	-121.4	-132.8	-1.7	-4.8	-59.1	130.5	5
2CMF	-85.4	-3.2	-76.3	95.2	-9.2	5.3	-14	-1.5	1
<b>1J06</b>	<b>-78.8</b>	<b>-1.8</b>	<b>-60.1</b>	<b>90.5</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>A</b>
1MAA	-83.4	-4.1	-58.4	114	-4.6	-2.3	1.7	23.5	A
2H9Y	-76.3	-7.8	-60.7	98.8	2.5	-6	-0.6	8.3	A
2HA0	-77	-19.7	-65.1	98.3	1.8	-17.9	-5	7.8	A
2HA2	-78.6	-11	-64.1	103.2	0.2	-9.2	-4	12.7	A
2HA3	-82.4	-5	-63.2	99.2	-3.6	-3.2	-3.1	8.7	A
2HA4	-92.5	8.2	-58.8	101.2	-13.7	10	1.3	10.7	A
2HA5	-74.6	-15.4	-66.2	101.4	4.2	-13.6	-6.1	10.9	A
2HA6	-89.4	7.6	-63.2	103.3	-10.6	9.4	-3.1	12.8	A
2HA7	-74.5	-13.4	-62.7	91.7	4.3	-11.6	-2.6	1.2	A

2C0P	-80.1	-2.9	-65.8	95.9	-1.3	-1.1	-5.7	5.4	A
2C0Q	-82.9	-1.7	-66.1	97.9	-4.1	0.1	-6	7.4	A
2JGE	-83	-11.4	-64.8	101.5	-4.2	-9.6	-4.7	11	A
2JGF	-87.1	-5.8	-65.2	100.8	-8.3	-4	-5.1	10.3	A
2JGG	-92	-4.1	-70.9	104.3	-13.2	-2.3	-10.8	13.8	A
2JGH	-90.5	-0.5	-68.8	100.7	-11.7	1.3	-8.7	10.2	A
2JGI	-94.4	-17.3	-65.6	98.1	-15.6	-15.5	-5.5	7.6	A
2JGJ	-82.1	-12.2	-63.4	99.4	-3.3	-10.4	-3.3	8.9	A
2JGK	-84.1	-23.7	-65.6	103.2	-5.3	-21.9	-5.5	12.7	A
2JGL	-81.9	-10.1	-66.5	100.1	-3.1	-8.3	-6.4	9.6	A
2JGM	-93	-16.6	-68.2	106.5	-14.2	-14.8	-8.1	16	A
1J07	-73.3	-12.2	-66.2	95	5.5	-10.4	-6.1	4.5	A
1KU6	-71.2	0.6	-72	108.5	7.6	2.4	-11.9	18	A
1MAH	-71.3	2.9	-66.9	106.7	7.5	4.7	-6.8	16.2	A
1N5M	-77.7	-13.6	-65.6	95.7	1.1	-11.8	-5.5	5.2	A
1N5R	-77.7	-7.3	-60.9	92.9	1.1	-5.5	-0.8	2.4	A
1Q83	-76.9	-22	-162.4	52.8	1.9	-20.2	-102.3	-37.7	B
1Q84	-74.1	-14	-72.9	100.1	4.7	-12.2	-12.8	9.6	A
2GYU	-70.2	-18.9	-154.4	-4.9	8.6	-17.1	-94.3	-95.4	C
2GYV	-58.5	-35.2	-164.7	-125.9	20.3	-33.4	-104.6	143.6	D
2GYW	-77	-10.8	-132.3	-119.2	1.8	-9	-72.2	150.3	E
1B41	-73.3	-16.7	-57.6	95.2	5.5	-14.9	2.5	4.7	A
1F8U	-71	-10.9	-58.3	93.9	7.8	-9.1	1.8	3.4	A
<b>3d/hAChE(Bind_1)</b>	-64.5	-29.5	-158.9	-122.1	14.3	-27.7	-98.8	147.4	F
<b>3d/hAChE(Bind_2)</b>	-63.3	-38	-168	-144.1	15.5	-36.2	-107.9	125.4	F
<b>3f/hAChE(Bind_1)</b>	-62	-10.1	-141.4	-101.1	16.8	-8.3	-81.3	168.4	E
<b>3f/hAChE(Bind_2)</b>	-68.5	-17.6	-142.6	-118	10.3	-15.8	-82.5	151.5	E
<b>3j/hAChE</b>	-49.9	-38.8	-169.5	-100.3	28.9	-37	-109.4	169.2	G
<b>3m/hAChE</b>	-55.6	-27.9	-62	108.7	23.2	-26.1	-1.9	18.2	A

---

**Tabella 3 G:** Valori degli angoli diedri calcolati per il residuo Y337 dell'ACHE.

Codice PDB	phi	psi	chi1	chi2	$\Delta\phi^a$	$\Delta\psi^a$	$\Delta\chi1^a$	$\Delta\chi2^b$	F <sup>c</sup>
<b>1EA5</b>	<b>-54.5</b>	<b>-46.8</b>	<b>-126.6</b>	<b>-48.9</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
1QID	-59.2	-46	-143.4	-66.3	-4.7	0.8	-16.8	-17.4	1
1QIE	-60.3	-43.2	-146.1	-67	-5.8	3.6	-19.5	-18.1	1
1QIF	-62.1	-41.9	-145.9	-61.1	-7.6	4.9	-19.3	-12.2	1
1QIG	-65.9	-40.8	-144.6	-67.5	-11.4	6	-18	-18.6	1
1QIH	-65.2	-39.4	-147	-73.6	-10.7	7.4	-20.4	-24.7	1
1QII	-64.1	-33.8	-146.8	-69.9	-9.6	13	-20.2	-21	1
1QIK	-54.1	-31.4	-143	-56.5	0.4	15.4	-16.4	-7.6	1
1QIM	-55.6	-33.8	-141.6	-43	-1.1	13	-15	5.9	1
1W75	-50	-46.6	-137.8	-53.7	4.5	0.2	-11.2	-4.8	1
2J4F	-59.9	-35.5	-166.1	-90.9	-5.4	11.3	-39.5	-42	2
1AMN	-37.5	-45.6	-174.1	-87.6	17	1.2	-47.5	-38.7	2
2ACE	-51.9	-37.6	-162.2	-85.2	2.6	9.2	-35.6	-36.3	2
2C4H	-58.8	-45.4	165	104.9	-4.3	1.4	-68.4	-26.2	3
2C58	-58.9	-45.7	179	-87.4	-4.4	1.1	-54.4	-38.5	2
2C5F	-57	-51.6	-166.5	78.4	-2.5	-4.8	-39.9	-52.7	2
2C5G	-58.5	-48.2	177.1	-88.5	-4	-1.4	-56.3	-39.6	2
1CFJ	-58.4	-48.7	-118.4	-58.7	-3.9	-1.9	8.2	-9.8	1
1SOM	-55.9	-46.6	-123.8	-57.9	-1.4	0.2	2.8	-9	1
1VXO	-55.8	-45.9	-126.2	-61.4	-1.3	0.9	0.4	-12.5	1
1VXR	-58.2	-45	-118.7	-43	-3.7	1.8	7.9	5.9	1
2BAG	-54.6	-48.7	-123.9	-45.2	-0.1	-1.9	2.7	3.7	1
2DPF	-61.9	-41	-109.6	-50.4	-7.4	5.8	17	-1.5	1
1OCE	-47.1	-35.1	-136.9	-87.8	7.4	11.7	-10.3	-38.9	4
1ACJ	-54.6	-44.2	157.1	61.8	-0.1	2.6	-76.3	-69.3	5
1AX9	-40.4	-52.2	-173.4	83.1	14.1	-5.4	-46.8	-48	2
1DX6	-52.9	-41	-142.1	-28.4	1.6	5.8	-15.5	20.5	1

1E 66	-53.7	-51.7	160.6	36.5	0.8	-4.9	-72.8	85.4	5
1GPK	-54.3	-43.2	-176.7	-97.7	0.2	3.6	-50.1	-48.8	2
1GPN	-58.6	-45.7	178.2	83	-4.1	1.1	-55.2	-48.1	2
1GQR	-63.8	-46.8	-123.9	117.4	-9.3	0	2.7	-13.7	1
1GQS	-59.5	-33.7	-167.7	-88.7	-5	13.1	-41.1	-39.8	2
1HBJ	-57.8	-50.2	174.8	-93.4	-3.3	-3.4	-58.6	-44.5	2
1QTI	-62	-35	-144.4	-42.5	-7.5	11.8	-17.8	6.4	1
1VOT	-50.4	-36.8	-171.4	90.5	4.1	10	-44.8	-40.6	2
1W6R	-59.6	-43.9	-178.9	-86.8	-5.1	2.9	-52.3	-37.9	2
2ACK	-52.5	-42.6	-177.2	87.4	2	4.2	-50.6	-43.7	2
1FSS	-46.3	-39.9	174.4	80.1	8.2	6.9	-59	-51	2
1ACL	-49.8	-36.2	-117.6	-23.8	4.7	10.6	9	25.1	1
1E3Q	-55.7	-37.2	-171.7	87.8	-1.2	9.6	-45.1	-43.3	2
1EVE	-54.2	-40.2	-130.6	-37.2	0.3	6.6	-4	11.7	1
1H22	-58.9	-42.5	-139	-37.6	-4.4	4.3	-12.4	11.3	1
1H23	-57.4	-42.4	-140.3	-32.7	-2.9	4.4	-13.7	16.2	1
1JJB	-55.7	-46	-126.1	-46.1	-1.2	0.8	0.5	2.8	1
1ODC	-73.2	-26.6	97.4	-105.6	-18.7	20.2	-136	-56.7	6
1U65	-55.3	-41.3	-147.5	-14.8	-0.8	5.5	-20.9	34.1	4
1UT6	-56.4	-40.3	134.1	61.2	-1.9	6.5	-99.3	-69.9	7
1W4L	-54.4	-40.8	-136.9	-38.6	0.1	6	-10.3	10.3	1
1W76	-54.8	-47	-140.1	-37.3	-0.3	-0.2	-13.5	11.6	1
1ZGB	-72.3	-24.9	95	60	-17.8	21.9	-138.4	-71.1	8
1ZGC	-62.7	-28.7	96.2	-111.9	-8.2	18.1	-137.2	-63	8
2CEK	-60.7	-45.9	76.1	-72.6	-6.2	0.9	-157.3	-23.7	9
2CKM	-58.5	-41	143.9	-114.7	-4	5.8	-89.5	-65.8	5
2CMF	-55.9	-52.1	160.6	-112.5	-1.4	-5.3	-72.8	-63.6	5



<b>1JO6</b>	<b>-48.8</b>	<b>-44.4</b>	<b>169</b>	<b>82</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>A</b>
1MAA	-43.5	-52.2	178	82.9	5.3	-7.8	9	0.9	A
2H9Y	-54.4	-37.9	164.5	89.7	-5.6	6.5	-4.5	7.7	A
2HA0	-46.8	-43.7	-178.1	85.3	2	0.7	12.9	3.3	A
2HA2	-52.8	-43.8	-161.5	117.5	-4	0.6	29.5	35.5	B
2HA3	-49	-43.2	-171.7	91.8	-0.2	1.2	19.3	9.8	A
2HA4	-47.1	-42.1	-172.5	99.4	1.7	2.3	18.5	17.4	A
2HA5	-43.5	-48	-165.6	92.6	5.3	-3.6	25.4	10.6	A
2HA6	-48.5	-40.3	-159.6	112.2	0.3	4.1	31.4	30.2	C
2HA7	-50.9	-48.6	-166.9	98.4	-2.1	-4.2	24.1	16.4	A
2C0P	-44.4	-42.3	-154.4	115.1	4.4	2.1	36.6	33.1	C
2C0Q	-48.9	-48.7	-161.7	98	-0.1	-4.3	29.3	16	A
2JGE	-55.4	-40.8	-172	91.6	-6.6	3.6	19	9.6	A
2JGF	-49.3	-48.4	-163.8	105.6	-0.5	-4	27.2	23.6	A
2JGG	-51.3	-41.9	-176.9	97.5	-2.5	2.5	14.1	15.5	A
2JGH	-52.5	-47.5	-148.9	114.6	-3.7	-3.1	42.1	32.6	C
2JGI	-36.8	-47.2	-172.1	92.5	12	-2.8	18.9	10.5	A
2JGJ	-53.4	-44.8	-176.8	98	-4.6	-0.4	14.2	16	A
2JGK	-45	-39.6	-171.5	93.9	3.8	4.8	19.5	11.9	A
2JGL	-48.4	-46.8	-166.2	88.1	0.4	-2.4	24.8	6.1	A
2JGM	-37.7	-46.4	-163.4	92.9	11.1	-2	27.6	10.9	A
1J07	-40	-51.9	-169.5	97.8	8.8	-7.5	21.5	15.8	A
1KU6	-72.7	-16.7	77.9	73.5	-23.9	27.7	-91.1	-8.5	D
1MAH	-42.9	-48.8	-173.1	88	5.9	-4.4	17.9	6	A
1N5M	-53.5	-39.2	-166.4	85.4	-4.7	5.2	24.6	3.4	A
1N5R	-43.1	-47.7	-177.2	101.6	5.7	-3.3	13.8	19.6	A
1Q83	-71.4	-37.9	158.1	59	-22.6	6.5	-10.9	-23	A
1Q84	-73.8	-31.4	96.7	72.6	-25	13	-72.3	-9.4	E
2GYU	-47.2	-40.6	-165.5	83.2	1.6	3.8	25.5	1.2	A

2GYV	-56.1	-41	-161.9	144	-7.3	3.4	29.1	62	F
2GYW	-52.7	-40.6	-161.2	142.7	-3.9	3.8	29.8	60.7	F
1B41	-36.2	-58.5	166.9	51.3	12.6	-14.1	-2.1	-30.7	B
1F8U	-35.5	-52.7	168.1	60.5	13.3	-8.3	-0.9	-21.5	A
<b>3d/hAChE(Bind_1)</b>	-53.8	-40.2	179.2	49.7	-5	4.2	10.2	-32.3	A
<b>3d/hAChE(Bind_2)</b>	-53.4	-42.9	173.4	63.7	-4.6	1.5	4.4	-18.3	A
<b>3f/hAChE(Bind_1)</b>	-46	-50.9	165.7	40.6	2.8	-6.5	-3.3	-41.4	B
<b>3f/hAChE(Bind_2)</b>	-62.1	-22.3	177.6	51.5	-13.3	22.1	8.6	-30.5	B
<b>3j/hAChE</b>	-77.7	60	-170.2	68.1	-28.9	104.4	20.8	-13.9	G
<b>3m/hAChE</b>	-56.2	-33.8	82.2	93.1	-7.4	10.6	-86.8	11.1	E

**Tabella 3 H:** Valori degli angoli diedri calcolati per il residuo Y341 dell'AChE.

<b>Codice PDB</b>	<b>phi</b>	<b>psi</b>	<b>chi1</b>	<b>chi2</b>	<b><math>\Delta\phi^a</math></b>	<b><math>\Delta\psi^a</math></b>	<b><math>\Delta\chi1^a</math></b>	<b><math>\Delta\chi2^b</math></b>	<b>F<sup>c</sup></b>
<b>1EA5</b>	<b>-78.7</b>	<b>-26.2</b>	<b>-83.2</b>	<b>62.5</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
1QID	-78.1	-26.7	-82.4	60.7	0.6	-0.5	0.8	-1.8	1
1QIE	-81.6	-32.4	-79.3	58.9	-2.9	-6.2	3.9	-3.6	1
1QIF	-80.6	-31.7	-79.2	58.4	-1.9	-5.5	4	-4.1	1
1QIG	-78.1	-31.6	-79.4	58.4	0.6	-5.4	3.8	-4.1	1
1QIH	-78.1	-30.2	-77.2	60.7	0.6	-4	6	-1.8	1
1QII	-80	-26.1	-80.4	62.6	-1.3	0.1	2.8	0.1	1
1QIJ	-77.9	-26.5	-78.2	59.3	0.8	-0.3	5	-3.2	1
1QIK	-82.1	-29.4	-79.5	58.8	-3.4	-3.2	3.7	-3.7	1
1QIM	-72.6	-22.7	-76.9	59.8	6.1	3.5	6.3	-2.7	1
1W75	-85.9	-30.2	-89.2	74.5	-7.2	-4	-6	12	1
2JF4	-97.9	-32.6	-87.6	72.4	-19.2	-6.4	-4.4	9.9	1
1AMN	-112.7	-36.5	-95.4	81.4	-34	-10.3	-12.2	18.9	1
2ACE	-94.5	-22.9	-84.8	65.4	-15.8	3.3	-1.6	2.9	1
2C4H	-75.3	-20.5	-80.2	59.3	3.4	5.7	3	-3.2	1
2C58	-67.9	-19.4	-78.4	60	10.8	6.8	4.8	-2.5	1

2C5F	-79.7	-25	-80.6	72.2	-1	1.2	2.6	9.7	1
2C5G	-73.7	-25.2	-78.3	63.6	5	1	4.9	1.1	1
1CFJ	-78.2	-31.5	-82.1	55.1	0.5	-5.3	1.1	-7.4	1
1SOM	-74.5	-25.4	-81.2	59.6	4.2	0.8	2	-2.9	1
1VX0	-74.2	-28.2	-78.5	59.3	4.5	-2	4.7	-3.2	1
1VXR	-73.2	-27.3	-75.4	60	5.5	-1.1	7.8	-2.5	1
2BAG	-76.4	-26.4	-78.2	66	2.3	-0.2	5	3.5	1
2DPF	-82.4	-19.1	-77.8	78.8	-3.7	7.1	5.4	16.3	1
1OCE	-88.1	-13.7	-90.2	74.8	-9.4	12.5	-7	12.3	1
1ACJ	-85.1	-18	-86	63.6	-6.4	8.2	-2.8	1.1	1
1AX9	-97.6	-27.7	-86.7	70.1	-18.9	-1.5	-3.5	7.6	1
1DX6	-71	-32.1	-82	56.1	7.7	-5.9	1.2	-6.4	1
1E 66	-80.3	-24.5	-81.4	66	-1.6	1.7	1.8	3.5	1
1GPK	-73.8	-17.6	-83.2	66	4.9	8.6	0	3.5	1
1GPN	-86.8	58.8	-76.7	64	-8.1	85	6.5	1.5	2
1GQR	-74.8	-26.1	-78.3	64.9	3.9	0.1	4.9	2.4	1
1GQS	-79.3	-26.4	-84	62	-0.6	-0.2	-0.8	-0.5	1
1HBJ	-69.1	-30.3	-81.2	64.4	9.6	-4.1	2	1.9	1
1QTI	-96.1	-21.6	-88.5	63	-17.4	4.6	-5.3	0.5	1
1VOT	-80.3	-16.7	-77.3	65.4	-1.6	9.5	5.9	2.9	1
1W6R	-67.4	-33.2	-84.5	56.4	11.3	-7	-1.3	-6.1	1
2ACK	-84.7	-21.3	-79.7	67.2	-6	4.9	3.5	4.7	1
1FSS	-109.8	36.9	-69.4	60.5	-31.1	63.1	13.8	-2	3
1ACL	-72.9	22	-75.5	73.8	5.8	48.2	7.7	11.3	4
1E3Q	-77.2	-23.1	-86.7	65.6	1.5	3.1	-3.5	3.1	1
1EVE	-91.9	-16.1	-81.6	69.3	-13.2	10.1	1.6	6.8	1
1H22	-82	-22.7	-81.5	62.9	-3.3	3.5	1.7	0.4	1
1H23	-78.6	-27.4	-80.3	69.9	0.1	-1.2	2.9	7.4	1
1JJB	-76.4	-24.5	-82.5	63.4	2.3	1.7	0.7	0.9	1

1ODC	-74.6	-31	-75	67.9	4.1	-4.8	8.2	5.4	1
1UT6	-73.7	-29.2	-77.8	67.2	5	-3	5.4	4.7	1
1U65	-78.8	-26.2	-82.1	66.3	-0.1	0	1.1	3.8	1
1W4L	-75	-24.5	-82.1	57.8	3.7	1.7	1.1	-4.7	1
1W76	-75.7	-36.2	-79.2	68.3	3	-10	4	5.8	1
1ZGB	-76.4	-24.6	-79.4	72.4	2.3	1.6	3.8	9.9	1
1ZGC	-81.3	-23.7	-79.9	76.3	-2.6	2.5	3.3	13.8	1
2CEK	-77	-27.9	-78.1	-107.2	1.7	-1.7	5.1	10.3	1
2CKM	-72.6	-39.6	-80.5	65.9	6.1	-13.4	2.7	3.4	1
2CMF	-81.4	-7.7	-75.8	78.8	-2.7	18.5	7.4	16.3	1
<b>1J06</b>	<b>-101.6</b>	<b>27</b>	<b>-74.3</b>	<b>86.9</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>A</b>
1MAA	-85.3	37.7	-76.2	77.5	16.3	10.7	-1.9	-9.4	A
2H9Y	-99.1	32.9	-71.7	91.9	2.5	5.9	2.6	5	A
2HA0	-96.8	19.9	-76.6	91.9	4.8	-7.1	-2.3	5	A
2HA2	-102.7	33.2	-73.1	93.6	-1.1	6.2	1.2	6.7	A
2HA3	-103.3	23.3	-76.1	93.4	-1.7	-3.7	-1.8	6.5	A
2HA4	-96.8	15.9	-79.5	95	4.8	-11.1	-5.2	8.1	A
2HA5	-101.9	14.7	-78.7	98.7	-0.3	-12.3	-4.4	11.8	A
2HA6	-104	23	-78.8	-82.7	-2.4	-4	-4.5	10.4	A
2HA7	-99.1	23.2	-80.6	92.9	2.5	-3.8	-6.3	6	A
2C0P	-82.3	-53.6	-80	84	19.3	-80.6	-5.7	-2.9	B
2C0Q	-87.6	-17.2	-78.8	83.9	14	-44.2	-4.5	-3	C
2JGE	-98	24.8	-75	92.7	3.6	-2.2	-0.7	5.8	A
2JGF	-94	32.2	-75.7	94.2	7.6	5.2	-1.4	7.3	A
2JGG	-99.9	27.7	-84.5	95.6	1.7	0.7	-10.2	8.7	A
2JGH	-106.7	28.3	-84.4	99.3	-5.1	1.3	-10.1	12.4	A
2JGI	-87.9	47.9	-76.8	81.5	13.7	20.9	-2.5	-5.4	A
2JGJ	-99.1	31	-74.1	87.8	2.5	4	0.2	0.9	A
2JGK	-92	71.2	-76	97	9.6	44.2	-1.7	10.1	A

2JGL	-99.7	28.9	-77.7	90.6	1.9	1.9	-3.4	3.7	A
2JGM	-100	56.2	-76.5	86.1	1.6	29.2	-2.2	-0.8	A
1J07	-99.1	28.6	-76.8	81.3	2.5	1.6	-2.5	-5.6	A
1KU6	-98.9	21.3	-78.1	82.6	2.7	-5.7	-3.8	-4.3	A
1MAH	-87.3	23.3	-71.5	84.4	14.3	-3.7	2.8	-2.5	A
1N5M	-92	22.7	-86.3	96.9	9.6	-4.3	-12	10	A
1N5R	-97	25.5	-78.6	86.2	4.6	-1.5	-4.3	-0.7	A
1Q83	-70.2	-75.1	-78.3	50.2	31.4	-102.1	-4	-36.7	D
1Q84	-89.8	23.9	-74.7	86.8	11.8	-3.1	-0.4	-0.1	A
2GYU	-109.6	4.3	-86.8	93.1	-8	-22.7	-12.5	6.2	A
2GYV	-103.7	46.1	-71.8	96.6	-2.1	19.1	2.5	9.7	A
2GYW	-101.8	18.2	-76.7	94.1	-0.2	-8.8	-2.4	7.2	A
1B41	-103.9	19.4	-79.8	-85.8	-2.3	-7.6	-5.5	7.3	A
1F8U	-108.9	20	-75.6	-85.2	-7.3	-7	-1.3	7.9	A
<b>3d/hAChE(Bind_1)</b>	-86.4	3.9	-72.7	-95.3	15.2	-23.1	1.6	-2.2	A
<b>3d/hAChE(Bind_2)</b>	-82.8	2.5	-82	-107.5	18.8	-24.5	-7.7	-14.4	A
<b>3f/hAChE(Bind_1)</b>	-102.5	40	-57.4	-90.2	-0.9	13	16.9	2.9	A
<b>3f/hAChE(Bind_2)</b>	-87.4	8.3	-65.8	-87.4	14.2	-18.7	8.5	5.7	A
<b>3j/hAChE</b>	-71.3	-36.9	-69.3	-91.3	30.3	-63.9	5	1.8	E
<b>3m/hAChE</b>	-92.3	45.7	-74.7	-74.7	9.3	18.7	-0.4	18.4	A

---

**Tabella 3 I:** Valori degli angoli diedri calcolati per il residuo Y449 dell' AChE.

Codice PDB	phi	psi	chi1	chi2	$\Delta\phi 1^a$	$\Delta\psi^a$	$\Delta\chi 1^a$	$\Delta\chi 2^b$	F <sup>c</sup>
<b>1EA5</b>	<b>-89.2</b>	<b>14.9</b>	<b>-77.8</b>	<b>77</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>1</b>
1QID	-88.7	13.1	-77.1	79.9	0.5	-1.8	0.7	2.9	1
1QIE	-89.6	17.4	-76.3	78.5	-0.4	2.5	1.5	1.5	1
1QIF	-90	15.3	-77.5	78.4	-0.8	0.4	0.3	1.4	1
1QIG	-89.7	16.3	-76.7	80.8	-0.5	1.4	1.1	3.8	1
1QIH	-95.7	15.3	-79.8	81.9	-6.5	0.4	-2	4.9	1
1QII	-95.9	11.2	-79.1	78.7	-6.7	-3.7	-1.3	1.7	1
1QIK	-77	12.4	-78.9	78.6	12.2	-2.5	-1.1	1.6	1
1QIM	-82.6	10.6	-77.3	73.7	6.6	-4.3	0.5	-3.3	1
1W75	-79.5	-3.7	-69.1	68.9	9.7	-18.6	8.7	-8.1	1
2J4F	-103.6	14.8	-80	84.8	-14.4	-0.1	-2.2	7.8	1
1AMN	-96.8	19.6	-71.2	82.8	-7.6	4.7	6.6	5.8	1
2ACE	-95.6	9.6	-75.7	77	-6.4	-5.3	2.1	0	1
2C4H	-92.4	19.1	-78	80.9	-3.2	4.2	-0.2	3.9	1
2C58	-92.4	19.7	-80.9	77.1	-3.2	4.8	-3.1	0.1	1
2C5F	-94.4	20.6	-79.3	76	-5.2	5.7	-1.5	-1	1
2C5G	-86.2	11.8	-79.9	75.5	3	-3.1	-2.1	-1.5	1
1CFJ	-100.1	15	-78.2	81.1	-10.9	0.1	-0.4	4.1	1
1SOM	-92.5	17.4	-78.6	80	-3.3	2.5	-0.8	3	1
1VXO	-92.1	13.6	-77.1	74.2	-2.9	-1.3	0.7	-2.8	1
1VXR	-87.2	14.3	-79.2	84	2	-0.6	-1.4	7	1
2BAG	-95	13.8	-78.7	75.7	-5.8	-1.1	-0.9	-1.3	1
2DPF	-85.3	18.9	-77	71.4	3.9	4	0.8	-5.6	1
1OCE	-110.3	37.3	-81.1	75.4	-21.1	22.4	-3.3	-1.6	1
1ACJ	-81.3	0.7	-77.9	76.6	7.9	-14.2	-0.1	-0.4	1
1AX9	-101.3	23.9	-81	-87.9	-12.1	9	-3.2	15.1	1
1DX6	-90.6	11.1	-75	78.3	-1.4	-3.8	2.8	1.3	1

1E 66	-89	10	-78	80.3	0.2	-4.9	-0.2	3.3	1
1GPK	-88.3	13	-81.2	76.6	0.9	-1.9	-3.4	-0.4	1
1GPN	-87.7	8.8	-80	78.8	1.5	-6.1	-2.2	1.8	1
1GQR	-88	20.9	-75.6	83.8	1.2	6	2.2	6.8	1
1GQS	-99.6	15	-82	69.1	-10.4	0.1	-4.2	-7.9	1
1HBJ	-63.8	-33.1	174.4	43.9	25.4	-48	-107.8	-33.1	2
1QTI	-100.1	13.2	-83.7	78.4	-10.9	-1.7	-5.9	1.4	1
1VOT	-95.7	7.9	-76.2	77.8	-6.5	-7	1.6	0.8	1
1W6R	-89.3	8.2	-73.8	77.5	-0.1	-6.7	4	0.5	1
2ACK	-96.3	5.4	-82.7	82.4	-7.1	-9.5	-4.9	5.4	1
1FSS	-88	29.4	-77.3	73.5	1.2	14.5	0.5	-3.5	1
1ACL	-85.2	-1.1	-72.5	74.2	4	-16	5.3	-2.8	1
1E3Q	-97.6	16.8	-84.6	78.4	-8.4	1.9	-6.8	1.4	1
1EVE	-92.9	25.4	-76.3	83.5	-3.7	10.5	1.5	6.5	1
1H22	-83.3	5.7	-74.7	77.5	5.9	-9.2	3.1	0.5	1
1H23	-86.6	10.1	-73.3	76.7	2.6	-4.8	4.5	-0.3	1
1JJB	-93.3	14.3	-76.6	77.6	-4.1	-0.6	1.2	0.6	1
1ODC	-87.3	7.2	-77	76	1.9	-7.7	0.8	-1	1
1U65	-90	20.2	-75	75.9	-0.8	5.3	2.8	-1.1	1
1UT6	-87.9	7	-74.1	69.6	1.3	-7.9	3.7	-7.4	1
1W4L	-88.8	11.2	-76	80.4	0.4	-3.7	1.8	3.4	1
1W76	-79.1	4.9	-71	71	10.1	-10	6.8	-6	1
1ZGB	-85.4	5.7	-80.2	71.1	3.8	-9.2	-2.4	-5.9	1
1ZGC	-89.6	-1	-88	79.2	-0.4	-15.9	-10.2	2.2	1
2CEK	-89	17.5	-75.7	77.1	0.2	2.6	2.1	0.1	1
2CKM	-84.5	12.6	-75.2	76	4.7	-2.3	2.6	-1	1
2CMF	-84.9	12.5	-73.5	82.3	4.3	-2.4	4.3	5.3	1
<b>1JO6</b>	<b>-87.8</b>	<b>10.7</b>	<b>-70.1</b>	<b>86.8</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>A</b>
1MAA	-93.8	33.5	-66.9	75	-6	22.8	3.2	-11.8	A

2H9Y	-98.5	14.6	-67.2	85.5	-10.7	3.9	2.9	-1.3	A
2HA0	-95.1	14.9	-71	86.9	-7.3	4.2	-0.9	0.1	A
2HA2	-96.5	15.4	-74.8	90.2	-8.7	4.7	-4.7	3.4	A
2HA3	-91.8	12.1	-71.1	87.1	-4	1.4	-1	0.3	A
2HA4	-98.1	13.4	-72.6	88.2	-10.3	2.7	-2.5	1.4	A
2HA5	-95.8	14	-73	89.8	-8	3.3	-2.9	3	A
2HA6	-93	13.3	-73.2	88.3	-5.2	2.6	-3.1	1.5	A
2HA7	-95.9	17.3	-69.5	89.3	-8.1	6.6	0.6	2.5	A
2JGE	-90.4	11.5	-73.3	93.9	-2.6	0.8	-3.2	7.1	A
2JGF	-92.9	11.8	-72.6	87.2	-5.1	1.1	-2.5	0.4	A
2JGG	-100.3	16	-73.5	93.6	-12.5	5.3	-3.4	6.8	A
2JGH	-91.1	13.4	-75.3	93.4	-3.3	2.7	-5.2	6.6	A
2JGI	-94.9	22.3	-72.5	95	-7.1	11.6	-2.4	8.2	A
2JGJ	-96.2	12.3	-71.4	91.2	-8.4	1.6	-1.3	4.4	A
2JGK	-94.8	18.5	-71.4	85.4	-7	7.8	-1.3	-1.4	A
2JGL	-97.5	17.1	-70.7	88.2	-9.7	6.4	-0.6	1.4	A
2JGM	-96.9	24.1	-75.4	93.2	-9.1	13.4	-5.3	6.4	A
1J07	-86.8	12.3	-71.3	88.4	1	1.6	-1.2	1.6	A
1KU6	-93.2	27.4	-72.3	82.7	-5.4	16.7	-2.2	-4.1	A
1MAH	-91.8	39.9	-68.9	72.5	-4	29.2	1.2	-14.3	A
1N5M	-88.8	11.4	-69.9	84.2	-1	0.7	0.2	-2.6	A
1N5R	-88.1	13.1	-70.7	87.9	-0.3	2.4	-0.6	1.1	A
1Q83	-94.9	17.4	-77.7	96.3	-7.1	6.7	-7.6	9.5	A
1Q84	-90.9	12.3	-74.1	93.9	-3.1	1.6	-4	7.1	A
2GYU	-92	13.8	-70.9	86.2	-4.2	3.1	-0.8	-0.6	A
2GYV	-97.1	19.8	-75.2	94.6	-9.3	9.1	-5.1	7.8	A
2GYW	-88.9	16.4	-70	87.5	-1.1	5.7	0.1	0.7	A
1B41	-106.3	16	-83.1	-75.1	-18.5	5.3	-13	18.1	A
1F8U	-98.7	33.5	-72.1	-77.3	-10.9	22.8	-2	15.9	A



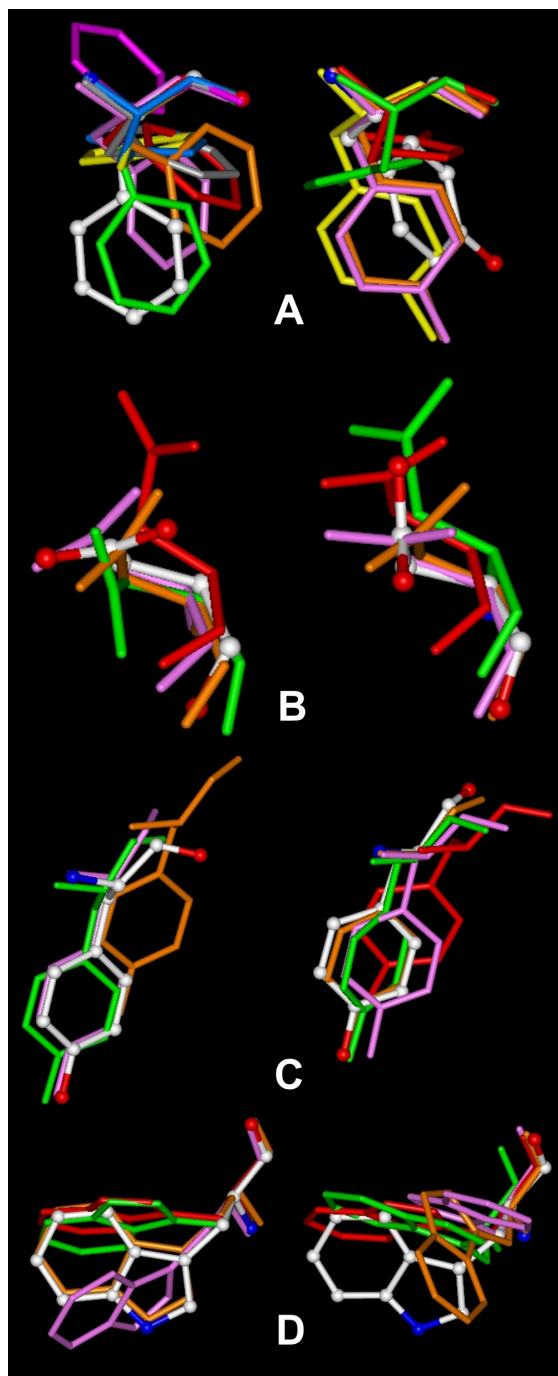
<b>3d/hAChE(Bind_1)</b>	-132.3	-13	-118.7	-81.2	-44.5	-23.7	-48.6	12	C
<b>3d/hAChE(Bind_2)</b>	-126.2	-2.5	-98.6	-84.6	-38.4	-13.2	-28.5	8.6	B
<b>3f/hAChE(Bind_1)</b>	-145.1	-23.7	-107.3	-67.8	-57.3	-34.4	-37.2	25.4	E
<b>3f/hAChE(Bind_2)</b>	-130.9	-32.2	-133.3	-74.4	-43.1	-42.9	-63.2	18.8	D
<b>3j/hAChE</b>	-107.6	-24.3	-145.1	-76.8	-19.8	-35	-75	16.4	F
<b>3m/hAChE</b>	-155.9	-43	-117.6	-84.4	-68.1	-53.7	-47.5	8.8	G

<sup>a</sup> Valori calcolati utilizzando la seguente equazione  $\Delta X = X - X_{\text{ref}}$ , dove  $X$  = valore dell'angolo diedro considerato;  $X_{\text{ref}}$  = valore di angolo diedro di riferimento; quando  $\Delta X > 180^\circ$  il valore dell'angolo viene normalizzato secondo l'equazione  $(360^\circ - |\Delta X|) * Y$ , dove  $Y = 1$  se  $X < 0$  e  $Y = -1$  se  $X > 0$ ; <sup>b</sup>quando  $\Delta X > 180^\circ$  il valore dell'angolo riportato è normalizzato secondo l'equazione  $(180^\circ - |\Delta X|) * Y$  a causa della simmetria presente nelle catene laterali di Tyr ed Asp; <sup>c</sup> le famiglie sono state classificate considerando un incremento dell'angolo di  $30^\circ$  nell'intervallo tra  $0^\circ$ - $359^\circ$  per ogni angolo diedro e tale intervallo è stato ristretto tra  $0^\circ$ - $179^\circ$  per il chi2 di Tyr e Asp.

Come illustrato in Figura 1A-D, il legame con l'inibitore induce movimenti concertati di specifici gruppi amminoacidici appartenenti a diverse sub-strutture dell'*active site gorge* dell'AChE. E' interessante notare come tali residui siano collocati in punti strategici del canale, ovvero nel sito catalitico (Y337), al centro del gorge (D74 ed Y341) e nel PAS (W286, numerazione dell'AChE umana) e come il loro movimento sia strettamente correlato alla potenza dell'inibitore ed alla sua modalità di binding (Tabella 2 e 3).

In accordo con ciò, i cambiamenti conformazionali osservati per il residuo W286 del PAS (Figura 1D, Tabella 3F) sono indotti solo ed esclusivamente da inibitori multisito a scheletro tacrinico (codice PDB delle strutture cristallografiche: 2CEK, 2CKM, 1ODC e 1Q83) e da alcuni antidoti (codici PDB:1GYU, 1GYV, e GYW) e possono essere essenzialmente suddivisi in due gruppi. Un gruppo include: i) le strutture di *TcAChE* in complesso con ligandi bivalenti a scheletro tacrinico a bassa

attività nanomolare, quali il composto **2a** (codice PDB: 2CEK), il composto **15** (Schema 2; codice PDB 2CKM)<sup>81</sup> ed il composto tacrina(8)-4-amminochinolina (codice PDB 1ODC) e ii) le strutture di mAChE in complesso con gli antidoti Obidossima (codice PDB: 1GYW) e Ortho-7 (codice PDB: 1GYV). L'altro gruppo è invece rappresentato dal cambiamento conformazionale indotto dall'inibitore ad attività fentomolare *syn*-TZ2PA6 in complesso con la mAChE (codice PDB:1Q83).<sup>82</sup>



**Figura 1.** Movimenti conformazionali della *TcAChE* (sinistra) e della *mAChE* (destra) osservati nelle strutture cristallografiche. A) Y337; B) D74; C) Y341; e D) W286. Le strutture di riferimento 1EA5 e 1J06 sono mostrate in ball e sticks e colorate per tipi atomici. Gli altri residui sono colorati secondo la famiglia di appartenenza riportata in Tabella 3: rosa, famiglia 2/B; arancio, famiglia 3/C; verde, famiglia 4/D; rosso, famiglia 5/E; blue, famiglia 6/F; grigio, famiglia 7/G; giallo, famiglia 8/H; magenta, famiglia 9/I.

Dai dati raccolti sembra esistere una stretta correlazione tra la potenza dell'inibitore ed il cambiamento conformazionale da esso indotto nel PAS. Se si confrontano per esempio le modalità di binding con la TcAChE dei composti **14** e **15** (Schema 2; codici PDB: 2CMF e 2CKM),<sup>83</sup> entrambi dimeri della tacrina ma con linker di connessione tra le porzioni tacriniche rispettivamente di 5 e 7 metileni, si può osservare come sebbene entrambi i composti presentino un binding simile al CAS ed interazioni simili con gli amminoacidi presenti nel PAS (W286, Y124, e Y72, numerazione della *hAChE*), solo il composto **15** sia in grado di indurre il movimento del W286 risultando così 20 volte più attivo del suo analogo con linker a 5 metileni. E' importante sottolineare che il movimento indotto dall'inibitore nel W286 è strettamente correlato alla capacità della sua porzione tetraidroacridinica di instaurare con esso una forte interazione di tipo  $\pi$ - $\pi$  assistita da carica, a cui partecipano altri residui aromatici del PAS quali Y72, che va a formare con essi un'interazione di triplo stacking Y72-tetraidroacridina-W286, e Y124, che instaura invece con essi uno stacking a T. Interessantemente, lo stesso tipo di interazioni viene inoltre riprodotto dall'altra porzione tacrinica nel CAS con i residui W86, Y337 e Y449, confermando la stretta correlazione esistente tra la capacità dell'inibitore di bloccare, attraverso un'interazione estremamente forte, questi punti strategici dell'enzima e la sua potenza.

In maniera analoga, anche gli inibitori della *mAChE* *syn*-TZ2PA6 ed *anti*-TZ2PA6, mostrano una modalità di legame simile all'enzima (codici PDB:1Q83 e 1Q84, rispettivamente), e differiscono solo ed esclusivamente per il movimento di

W286 indotto da *syn*-TZ2PA6. Anche in questo caso, la forte interazione di triplo stacking stabilita da *syn*-TZ2PA6 con W286, Y72 e Y124 al PAS, sembra contribuire significativamente alla maggiore affinità dell'isomero *syn*- per l'enzima (*syn*-TZ2PA6 è 20 volte più potente del suo isomero *anti*).

L'analisi condotta conferma, infine, la presenza di movimenti concertati tra specifiche sub-strutture del CAS e del PAS, evidenziando l'importanza del controllo allosterico reciproco tra CAS e PAS nelle diverse funzioni esplicate dall'AChE. A conferma di ciò, l'interazione di un inibitore del CAS come la tacrina (codice PDB:1ACJ) con F330 (Y337 in *hAChE*), induce, in maniera allosterica, un cambiamento conformazionale di W279 (W286 in *hAChE*) (Figura 1A,D, Tabelle 3F,G) e d'altro canto, inibitori del sito periferico, quali la fasciculina II (codici PDB:1FSS e 1B41) e la gallamina (codice PDB:1N5M), inducono rispettivamente cambiamenti conformazionali delle catene laterali di Y337 e di W86 nel CAS (Figura 1A e Tabella 3 G).

### ***3.4b Analisi Bioinformatica: Identificazione degli hot spot della proteina.***

Le colinesterasi sono composte rispettivamente da domini coinvolti nella loro funzione catalitica e da domini coinvolti nelle loro funzioni “non classiche”,<sup>84</sup> e coerentemente, un sempre maggior numero di evidenze sperimentali assegna un ruolo

cruciale alle interazioni proteina-proteina intra- e/o inter-molecolari in queste funzioni.

In generale, le interazioni proteina-proteina richiedono una complementarietà tra le due superfici di interazione ed un certo grado di flessibilità e di adattabilità nella struttura della proteina. Le fluttuazioni attraverso diversi stati conformazionali, infatti, possono richiedere scambi nelle interazioni tra hot spots complementari.<sup>85</sup> L'abilità di predire a priori questi siti di contatto (hot spots) può chiaramente restringere la ricerca per la progettazione di composti in grado di interferire con specifiche funzioni di una proteina.

In accordo con ciò, è stata eseguita una dettagliata analisi bioinformatica della *hAChE* e della *hBuChE* allo scopo di identificare quei domini di interazione proteina-proteina, in termini di motivi lineari e/o elementi strutturali, che potessero contribuire all'architettura dell'*active site gorge* e guidare i movimenti e le fluttuazioni di questa famiglia di enzimi (vedi Materiali e Metodi per i dettagli).

L'analisi condotta ha consentito l'identificazione di diversi cluster di amminoacidi idrofobici, simili in termini di composizione (ConSeq)<sup>54</sup> e relativa posizione (cioè distanze sia tra gli atomi C $\alpha$  che tra i centroidi delle catene laterali, Tabelle 4 e 5), ai residui di interazione appartenenti ai domini Src-homology 3 (SH3)<sup>86,87,88</sup> e ai motivi del tipo LxxLL<sup>89,90,91,92,93</sup> conosciuti per regolare, attraverso le interazioni proteina-proteina, una varietà di conformazioni e funzioni. I motivi individuati sono elencati nelle Tabelle 4 e 5 di seguito riportate, mentre alcuni dei più

rilevanti domini di interazione proteina-proteina identificati sono illustrati in Figura 2A e 2B.

**Tabella 4 A:** Cluster di amminocidi aromatici del tipo SH3 conservati in *hAChE* e *hBuChE*.

<i>hAChE</i>				<i>hBuChE</i>			
Residui SH3-like	Residui	C $\alpha$ Dist.	Centr. Dist.	Residui SH3-like	Residui	C $\alpha$ Dist.	Centr. Dist.
W439-Y77-F338	W439-Y77	11.27	7.31	W430-F329-F73	W430-F329	11.94	10.42
	W439-F338	11.90	10.09		W430-F73	11.29	6.59
	F338-Y77	13.31	13.41		F329-F73	13.13	12.36
W439-F80-Y77	W439-F80	9.06	4.89	W430-F76-F73	W430-F76	9.22	4.87
	W439-Y77	11.27	7.31		W430-F73	11.29	6.59
	F80-Y77	5.36	5.89		F73-F76	5.53	6.20
W439-W86-Y77	W439-W86	13.22	8.24	W430-W82-F73	W430-W82	13.34	8.31
	W439-Y77	11.27	7.31		W430-F73	11.29	6.59
	Y77-W86	12.32	13.47		W82-F73	11.68	12.45
W442-F346-F338	W442-F346	10.67	6.30	W433-F329-F337	W433-F329	12.85	12.75
	W442-F338	13.01	12.70		W433-F337	10.69	6.24
	F346-F338	9.52	11.97		F329-F337	9.92	12.14
W86-Y133-Y449	W86-Y449	11.22	5.83	W82-Y440-Y128	W82-Y440	11.18	5.50
	W86-Y133	10.41	7.23		W82-Y128	10.48	7.42
	Y133-Y449	11.61	11.28		Y128-Y440	11.78	11.29
W86-Y119-Y133	W86-Y119	10.37	10.89	W82-Y128-Y114	W82-Y128	10.48	7.42
	W86-Y133	10.41	7.23		W82-Y114	10.47	11.33
	Y133-Y119	8.29	6.71		Y128-Y114	8.16	6.69
W86-Y449-Y119	W86-Y449	11.22	5.83	W82-Y114-Y440	W82-Y440	11.18	5.50
	W86-Y119	10.37	10.89		W82-Y114	10.47	11.33
	Y119-Y449	12.88	16.13		Y440-Y114	13.22	16.26
W86-Y77-F80	W86-Y77	12.32	13.47	W82-F73-F76	W82-F73	11.68	12.45

	W86-F80	10.80	10.68		W82-F76	10.76	10.86
	F80-Y77	5.36	5.89		F73-F76	5.53	6.20
W117-Y119-Y133	W117-Y119	6.30	7.93	W112-Y128-Y114	W112-Y128	8.05	4.73
	W117-Y133	8.57	4.97		W112-Y114	6.35	7.87
	Y133-Y119	8.29	6.71		Y128-Y114	8.16	6.69
W117-Y119-F200	W117-Y119	6.30	7.93	W112-Y114-F195	W112-F195	8.64	4.89
	W117-F200	5.32	4.69		W112-Y114	6.35	7.87
	F200-Y119	8.87	12.02		Y114-F195	4.95	12.15
W117-F200-F455	W117-F200	5.32	4.69	W112-F446-F195	W112-F446	10.28	4.86
	W117-F455	10.56	4.90		W112-F195	4.95	4.89
	F200-F455	11.42	5.71		F195-F446	11.11	5.37
W117-Y133-F455	W117-F455	10.56	4.90	W112-F446-Y128	W112-F446	10.28	4.86
	W117-Y133	8.57	4.97		W112-Y128	8.05	4.73
	Y133-F455	6.42	6.03		Y128-F446	6.49	6.17
W117-F200-Y133	W117-F200	5.32	4.69	W112-F195-Y128	W112-Y128	8.05	4.73
	W117-Y133	8.57	4.97		W112-F195	4.95	4.89
	Y133-F200	11.84	9.29		Y128-F195	11.23	9.22

**Tabella 4 B:** Cluster di amminocidi aromatici del tipo SH3 presenti nella *hAChE* e non conservati nella *hBuChE*.

<i>hAChE</i>			
Residui SH3-like	Residui	C $\alpha$ Dist.	Centroid Dist.
	W439-Y449	10.25	6.07
W439-Y449-Y337	W439-Y337	8.56	5.87
	Y449-Y337	10.33	7.84
	W439-Y337	8.56	5.87
W439-Y337-Y77	W439-Y77	11.27	7.31
	Y337-Y77	12.97	9.77



	W439-Y337	8.56	5.87
W439-Y337-F338	W439-F338	11.90	10.09
	Y337-F338	3.83	4.55
	W439-W86	13.22	8.24
W439-W86-Y337	W439-Y337	8.56	5.87
	Y337-W86	13.04	7.52
	W442-F346	10.67	6.30
W442-F346-Y337	W442-Y337	10.09	11.12
	Y337-F346	9.92	12.20
	W442-Y337	10.09	11.12
W442-Y337-F338	W442-F338	13.01	12.70
	Y337-F338	3.83	4.55
	W86-Y337	13.04	7.52
W86-Y337-Y449	W86-Y449	11.22	5.83
	Y449-Y337	10.33	7.84
	W86-Y124	11.69	11.01
W86-Y124-Y72	W86-Y72	11.23	13.72
	Y72-Y124	7.07	6.44
	W86-F123	12.97	15.18
W86-F123-Y72	W86-Y72	11.23	13.72
	Y72-F123	10.82	15.51
	W86-F123	12.97	15.18
W86-F123-Y119	W86-Y119	10.37	10.89
	F123-Y119	9.27	8.96
	W286-Y124	9.86	5.44
W286-Y124-Y72	W286-Y72	9.43	4.97
	Y72-Y124	7.07	6.44
W286-Y124-F297	W286-Y124	9.86	5.44
	W286-F297	7.74	8.15

	Y124-F297	7.09	5.48
	W286-F297	7.74	8.15
W286-Y72-F297	W286-Y72	9.43	4.97
	Y72-F297	11.73	11.26
	W286-F299	9.18	9.65
W286-F299-F297	W286-F297	7.74	8.15
	F299-F297	5.99	11.51
	W286-F123	12.48	13.31
W286-F123-Y72	W286-Y72	9.43	4.97
	Y72-F123	10.82	15.51
	W286-F123	12.48	13.31
W286-F123-F297	W286-F297	7.74	8.15
	F123-F297	7.27	7.54
	W286-F295	12.39	13.04
W286-F295-Y72	W286-Y72	9.43	4.97
	Y72-F295	15.74	15.55
	W286-F295	12.39	13.04
W286-F295-F297	W286-F297	7.74	8.15
	F295-F297	6.84	5.98
	W286-F295	12.39	13.04
W286-F123-F295	W286-F123	12.48	13.31
	F295-F123	11.36	11.06
	W286-F295	12.39	13.04
W286-Y341-F295	W286-Y341	13.00	8.89
	Y341-F295	8.93	10.59
	W286-Y341	13.00	8.89
W286-Y341-F297	W286-F297	7.74	8.15
	Y341-F297	12.62	9.90

**Tabella 4 C:** Cluster di amminocidi aromatici del tipo SH3 presenti nella *h*BuChE e non conservati nella *h*AChE.

<i>h</i> BuChE			
Residui SH3-like	Residui	C $\alpha$ Dist.	Centroid Dist.
W430-W433-F329	W430-W433	8.48	9.35
	W430-F329	11.94	10.42
	W433-F329	12.85	12.75
W430-W433-F337	W430-W433	8.48	9.35
	W430-F337	12.70	12.98
	W433-F337	10.69	6.24
W430-Y332-F337	W430-Y332	13.16	7.47
	W430-F337	12.70	12.98
	Y332-F337	8.52	11.72
W430-Y332-F329	W430-Y332	13.16	7.47
	W430-F329	11.94	10.42
	Y332-F329	5.45	7.50
W430-W82-Y440	W430-W82	13.34	8.31
	W82-Y440	11.18	5.50
	W430-Y440	10.69	6.53
W430-W82-F76	W430-W82	13.34	8.31
	W430-F76	9.22	4.87
	W82-F76	10.76	10.86
W112-F446-Y114	W112-F446	10.28	4.86
	W112-Y114	6.35	7.87
	F446-Y114	12.49	11.54

**Tabella 5 A:** Motivi del tipo LxxLL conservati in *hAChE* e *hBuChE*.

<i>hAChE</i>				<i>hBuChE</i>			
Sequenza	Residui	C $\alpha$ Dist.	Centr. Dist.	Sequenza	Residui	C $\alpha$ Dist.	Centr. Dist.
<sup>426</sup> YAYVF <sub>430</sub>	Y426-F430	13.09	17.19	<sup>417</sup> FFYYF <sub>421</sub>	F417-F421	12.89	17.48
	Y426-V429	10.73	14.82		F417-Y420	10.51	17.00
	F430-V429	3.79	8.91		Y420-F421	3.82	9.22
<sup>451</sup> IEFIF <sub>455</sub>	I451-F455	6.36	6.31	<sup>442</sup> IEFVF <sub>446</sub>	I442-F446	6.27	6.38
	I451-I454	5.11	6.77		I442-V445	5.11	6.34
	I454-F455	3.80	6.55		V445-F446	3.85	5.90
<sup>453</sup> FIFGL <sub>457</sub> <sup>a</sup>	F453-I457	5.87	8.19	<sup>444</sup> FVFGL <sub>448</sub>	F444-L448	6.20	8.92
	I454-I457	7.85	9.92		V445-L448	8.03	9.76
	F453-I454	3.81	8.51		F444-V445	3.79	8.55

**Tabella 5 B:** Motivi del tipo LxxLL presenti nella *hAChE* e non conservati nella *hBuChE*.

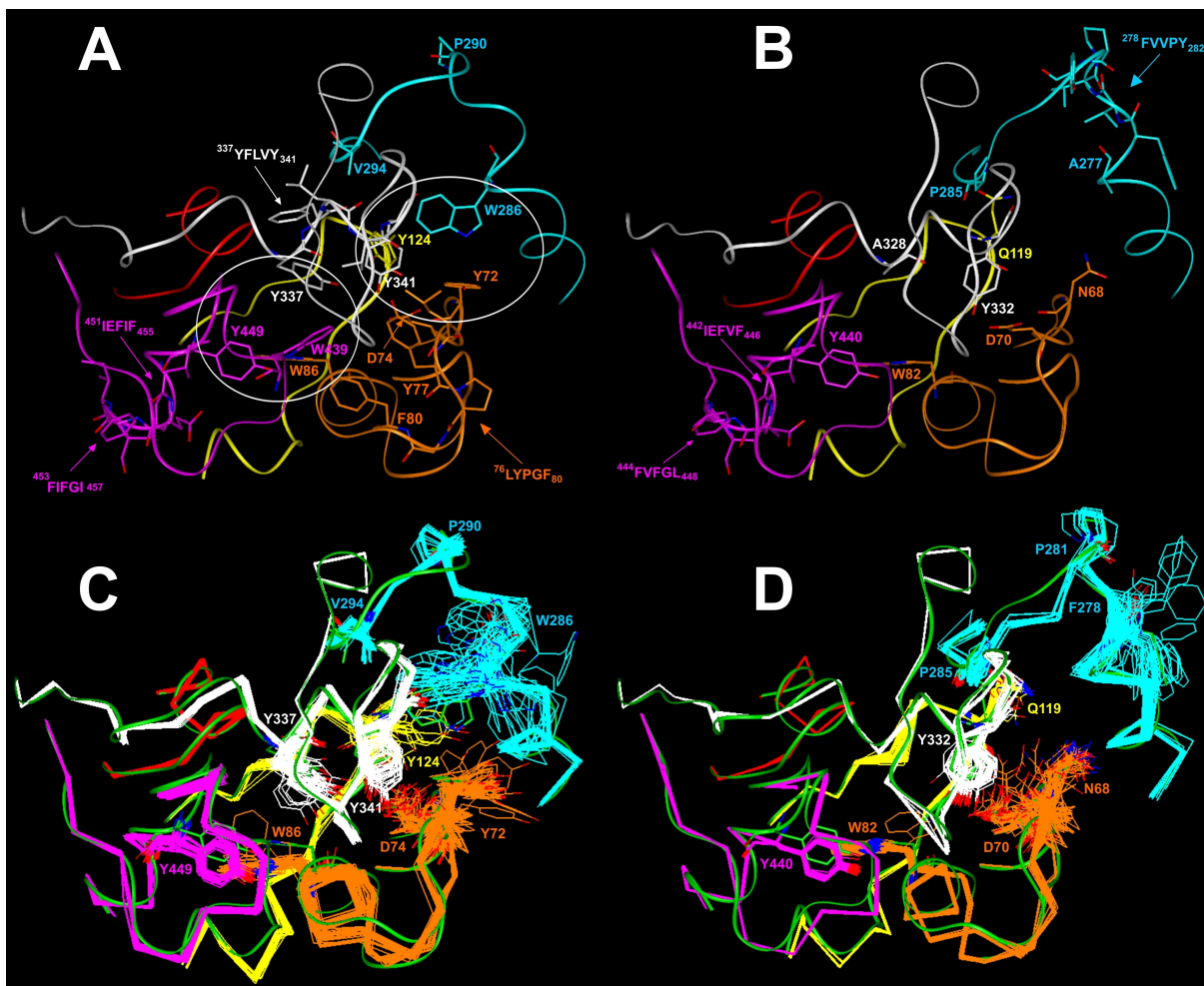
<i>HACHe</i>			
Sequenza	Residui	C $\alpha$ Dist.	Centroid Dist.
<sup>337</sup> YFLVY <sub>341</sub> <sup>b</sup>	Y337-Y341	8.33	5.59
	Y337-V340	6.60	6.98
	V340-Y341	3.80	5.69
	F338-Y341	5.72	7.53
	Y337-F338	3.83	4.55
<sup>115</sup> LVWIY <sub>119</sub> <sup>b</sup>	L115-Y119	12.73	16.18
	L115-I118	9.96	11.92
	I118-Y119	3.80	7.18
	V116-Y119	9.95	11.91
	L115-V116	3.80	7.84

<sup>76</sup> LYPGF <sub>80</sub> <sup>a</sup>	L76-F80	8.58	8.85
	Y77-F80	5.36	5.89
	L76-Y77	3.80	3.83
<sup>359</sup> FLAGV <sub>363</sub> <sup>a</sup>	F359-V363	6.32	5.59
	L360-V363	5.30	6.69
	F359-L360	3.79	5.60

**Tabella 5 C:** Motivi del tipo LxxLL presenti nella *hBuChE* e non conservati nella *hAChE*.

<i>hBuChE</i>			
Sequenza	Residui	Cα Dist.	Centroid Dist.
<sup>278</sup> FVVPY <sub>282</sub> <sup>a</sup>	F278-Y282	8.30	12.46
	V279-Y282	8.95	13.94
	F278-V279	3.79	8.29

<sup>a</sup>Motivi Invertiti; <sup>b</sup>Motivi Palindromi.



**Figura 2.** Substrutture presenti nell'active site gorge della *hAChE* (A; PDB: 1B41) e della *hBuChE* (B; PDB: 1P0I):  $\Omega$  loop (arancio); regione della His catalitica (magenta); regione del Glu catalitico (bianco), and regione della Ser catalitica (rosso); muro delle Gly (giallo); PAS (ciano). I potenziali domini di interazione proteina-proteina sono evidenziati da frecce (motivi) e cerchi (domini). (C) Sovrapposizione per atomi di carbonio C $\alpha$  dei risultati di docking per composti **3a-m** in complesso con la *hAChE* con la struttura cristallografica della *hAChE* (mostrata con i ribbon in verde). (D) Sovrapposizione per atomi di carbonio C $\alpha$  dei risultati di docking per composti **3a-m** in complesso con la *hBuChE* con la struttura cristallografica della *hBuChE* (mostrata con ribbon in verde).

Come è possibile notare in Figura 2A e B, i cluster idrofobici identificati appartengono a sub-strutture differenti dell'enzima che cooperano tra loro per assicurarne il perfetto funzionamento (apertura e chiusura del gorge, respiro dell'enzima), costituendo così gli hot spots responsabili delle fluttuazioni e del funzionamento delle colinesterasi umane. E' chiaro che tali domini sono essi stessi

generati dal reciproco arrangiamento di altri domini di interazione proteina-proteina, che partecipano all'architettura del gorge e mostrano caratteristiche strutturali analoghe (Tabelle 3, 4 e 5, Figura 2A).

In particolare, lungo l'*active site gorge* delle colinesterasi è stato identificato il motivo del tipo LxxLL, che si può leggere da entrambi i lati,  $_{337}\text{YFLVY}^{341}$ , presente nella regione del Glu catalitico della hAChE (Figura 2A, in bianco), il quale può interagire con un motivo del tipo LxxLL invertito, quale il motivo  $_{76}\text{LYPGF}^{80}$  presente nella regione dell' $\Omega$  loop C69-C96 (Figura 2A, arancio), ove è presente il residuo D74, e con il motivo del tipo LxxLL  $_{451}\text{IEFIF}^{455}$  presente nella regione della His catalitica (Figura 2A, magenta). L76 ( $_{76}\text{LYPGF}^{80}$ ), infatti, stabilisce interazioni idrofobiche con i residui Y341 e V340 (distanze tra i centroidi rispettivamente di 4.67 Å e 5.85 Å) presenti nel motivo  $_{337}\text{YFLVY}^{341}$ . Inoltre il residuo F80 interagisce attraverso uno stacking a T con W439 (presente nella regione dell'istidina catalitica) andando così a formare un dominio di interazione del tipo SH3 costituito da W439, Y77 e F80 (Figura 2A, Tabella 4). L'interazione tra questi cluster amminoacidici gioca un ruolo critico nel funzionamento della hAChE, e il residuo D74 presente nell' $\Omega$  loop (C69-C96) ne modula il controllo allosterico tra CAS e PAS (meccanismo di respiro). Sulla base dell'analisi condotta, sono stati individuati due principali hot spots nell'*active site gorge* dell'hAChE (cerchiati in bianco nella Figura 2A; Tabelle 4 e 5): uno nel CAS costituito da W86 ( $\Omega$ \_loop), Y337 (regione del Glu catalitico), e Y449 (regione della His catalitica) ed uno nel PAS costituito da Y341 (regione del glu catalitico), W286 (PAS), Y124 (muro delle gly), e Y72

( $\Omega$ \_loop). A connettere strutturalmente e funzionalmente questi hot spots è l'interazione alternata con CAS e PAS, e quindi il movimento, del residuo D74 presente nell'  $\Omega$ -loop, guidato a sua volta dalle fluttuazioni del motivo LxxLL  $_{76}\text{LYPGF}^{80}$  ( $\Omega$ -loop) e del residuo Y341 ( $_{337}\text{YFLVY}^{341}$ ).

Nella *hBuChE*, il corrispondente  $\Omega$  loop (C65-C92) non gioca lo stesso ruolo funzionale, anche se il residuo D70 è conservato in questo enzima (Figura 2A vs Figura 2B). In accordo con ciò, non sono stati identificati nella *hBuChE* motivi del tipo LxxLL sull' $\Omega$ -loop (Tabella 5 A e C). Come riportato in Figura 2B ed in tabella 5, nella *hBuChE*, si possono identificare motivi LxxLL solo nella regione della His catalitica e nel sito periferico. In aggiunta, come riportato in Figura 2C-D, i movimenti osservati per alcuni amminoacidi durante i nostri risultati di docking flessibile sono abbastanza differenti tra *hAChE* e *hBuChE*. Per esempio, nella *hAChE*, si può osservare una significativa fluttuazione del  $\Omega$ -loop C69-C96; in particolare, D74 può stabilire legami ad idrogeno assistiti da carica con diversi residui di Tyr che sono parte degli hot spots del CAS (W86, Y449 e Y337) o del PAS (Y341, W286, Y72, e Y124). L'interazione tra D74 ed il network di Tyr può guidare la reciproca modulazione allosterica tra CAS/PAS consentendo i cambiamenti conformazionali che contribuiscono alle fluttuazioni ed al funzionamento dell'AChE. E' interessante notare che tre di questi cinque residui di Tyr non sono conservati nell'*active site gorge* della *hBuChE*. A conferma di ciò, lo sviluppo del composto **2b**<sup>63</sup>, in cui è stato inserito una funzione protonabile extra al centro del linker al fine di garantire l'interazione con D74 dell'AChE, manifesta un notevole aumento di



potenza inibitoria sulla *hAChE* (**2b** vs **15**, Schema 2, Tabella 1) ma non sulla *hBuChE* (**2b** vs **15**, Tabella 1), in cui sebbene vi sia D70 non vi è il network di Tyr.

In conclusione, il mio lavoro ha condotto alla identificazione di cluster di amminoacidi presenti lungo l'*active site gorge* della *hAChE* che risultano essere significativamente coinvolti nelle fluttuazioni e nel funzionamento di questo enzima (Figura 1 e Tabelle 2 e 3) e del loro ruolo nel legame con gli inibitori (Figura 2, Tabelle 4 e 5). Tali residui rappresentano punti strategici (hot spots) della proteina, il cui movimento e/o interazione reciproca può guidarne il passaggio attraverso stati conformazionali diversi.

La mia strategia di progettazione è stata quindi basata sull'assunzione che la capacità di un inibitore di interagire specificamente e selettivamente con essi possa essere predittiva della sua potenza.

Su queste basi, sono stati sviluppati inibitori ad attività picomolare delle ChE umane, caratterizzati da differenti profili di selettività tra la *hAChE* e la *hBuChE*.

### ***3.4c Relazione Struttura Attività dei composti 3a-m***

Come ampiamente illustrato nei paragrafi precedenti, l'implementazione della strategia di progettazione utilizzata, ha condotto allo sviluppo di una nuova serie di inibitori multisito a scheletro tacrinico (**3a-m**, Schema 1).

Come previsto, la natura e la lunghezza dello spaziatore alchilico che connette le porzioni tacriniche che vanno ad interagire con gli hot spots identificati nel CAS e nel

PAS dell'AChE, modula la potenza inibitoria e la selettività dei nuovi composti (Tabella 1).

Le precedenti relazioni struttura-attività,<sup>83</sup> relative agli omodimeri della tacrina, avevano dimostrato che lo spaziatore alchilico di 7 metileni (**15**, Schema 2) è quello di lunghezza ottimale per gli inibitori dell'AChE, dal momento che esso consente alle porzioni tetraidroacridiniche che connette, di interagire contemporaneamente, attraverso interazioni di tipo  $\pi$ - $\pi$  stacking a sandwich, con il CAS e che con il PAS.

L'introduzione successiva di un punto di interazione al centro del linker alchilico del composto **15**, ha portato poi ad un significativo aumento dell'attività inibitoria (**2b** vs **15**) sulla *hAChE* poiché esso ha consentito l'introduzione di un ulteriore punto d'interazione con l'enzima collocato al centro del gorge (mid gorge).

La modulazione della natura e delle dimensioni del gruppo funzionale inserito ha infine consentito di bilanciare potenza e selettività degli inibitori sviluppati sulle colinesterasi umane come risultato del raggiungimento dei diversi hot spots in esse presenti.

I risultati ottenuti hanno confermato l'importanza delle fluttuazioni conformazionali nella progettazione razionale di inibitori specifici e selettivi per enzimi multifunzionali come le colinesterasi.

A conferma di ciò, l'estensione del linker del composto **2b** (il più potente inibitore della *hAChE* nella serie originale) produce un significativo aumento della potenza inibitoria e della selettività sulla *hAChE*, rispetto alla *hBuChE* (**3d**,  $K_i hAChE = 11.8$  pM,  $K_i hBuChE = 819$  pM e *hAChE/hBuChE* ratio of 0.01; Tabella

1). Parimenti a **2b**, il composto **3d** interagisce con i tre siti di riconoscimento identificati (CAS, mid-gorge (D74), e PAS) (Figura 3A), ma **3d** possiede quella flessibilità necessaria per “congelare” l'*active site gorge* della hAChE in una specifica conformazione, e per opporsi dinamicamente al respiro catalitico dell'enzima (in particolare per ciò che concerne il movimento del  $\Omega$ -loop, Figura 2C e 3).

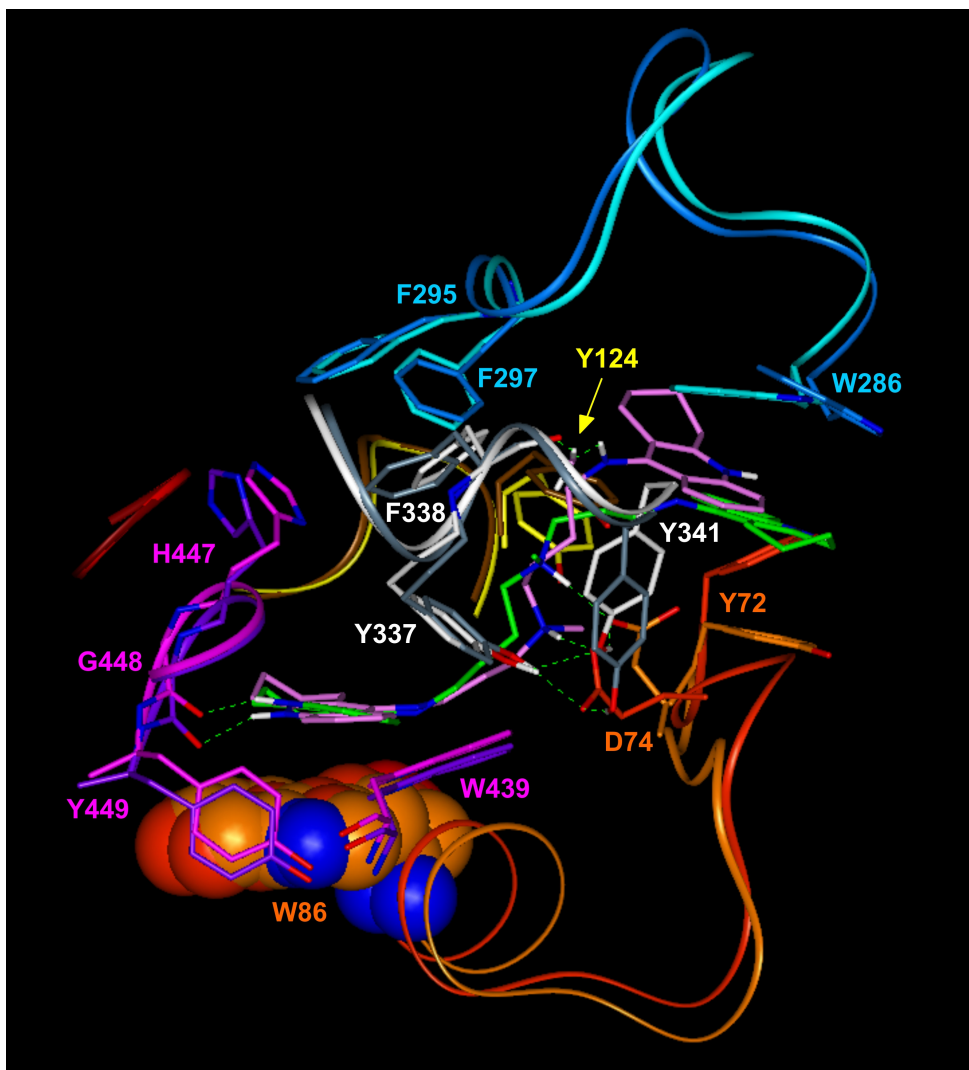
Come illustrato in Figura 3, le “fluttuazioni allosteriche” del  $\Omega$ -loop consentono di avere due possibili modalità di binding per il composto **3d**, entrambe energeticamente accessibili (Tabella 6), che contribuiscono alla potenza ed alla selettività di questo composto per i differenti stati conformazionali in cui la hAChE può trovarsi. Nella prima modalità di binding possibile, illustrato in figura 3 con il ligando in verde e la proteina di colore più chiaro, **3d** (Bind\_1; Figura 3, ligando verde), posizionando il linker a 4 metileni alla base del gorge, è in grado di: i) interagire con il CAS mediante un legame idrogeno con il gruppo carbonilico del backbone della G448 e attraverso un'interazione simultanea del tipo  $\pi$ - $\pi$  stacking con W86 ed Y337, stabilizzando così la conformazione chiusa del hot spot del CAS; ii) instaurare attraverso la sua funzione protonata un network di legami idrogeno con le catene laterali di D74, Y337 e Y124, ed un'interazione di tipo cation- $\pi$  con la catena laterale della Y341 (motivo del tipo LxxLL<sub>337</sub>YFLVY<sup>341</sup>), guidando così il binding simultaneo di D74 ( $\Omega$ -loop) ad Y337 (CAS) e a Y341 e Y124 (PAS); iii) stabilire un triplo stacking  $\pi$ - $\pi$  con W286 e Y72, così da indurre la rotazione della catena laterale di W286 verso l'anello aromatico di Y124 (121°, Tabella 3 F) e rafforzare,

conseguentemente, le interazioni con l'hot spot presente al PAS (W286-Y72-Y124; Figura 3).

In maniera piuttosto interessante, il composto **3d** è in grado di instaurare lo stesso tipo di interazioni lungo l'*active site gorge* della hAChE anche quando posiziona il linker a 4 metileni dal lato del PAS come illustrato in Figura 3 (Bind\_2; ligando rosa), ed il complesso che si forma risulta energeticamente comparabile a quello precedente (Tabella 6). Ciò dimostra che l'elevata potenza inibitoria del composto **3d** (46 volte più attivo del composto **2b**) risiede proprio nella sua capacità di legarsi con diverse modalità all'enzima bloccandone comunque i punti critici essenziali per il movimento conformazionale.

In particolare, la perfetta e contemporanea interazione delle porzioni tetraidroacridiniche del composto **3d** con CAS e PAS è garantita in entrambe le modalità di binding grazie all'elevata flessibilità dell' $\Omega$ -loop che consente al residuo di D74, che costituisce il punto d'aggancio centrale lungo l'*active site gorge*, di raggiungere in ogni caso la funzione protonabile e mantenere contemporaneamente il network con le Tyr circostanti.

D'altro canto però il composto **3d** possiede di per sé la flessibilità necessaria per opporsi dinamicamente alla fluttuazione dell'AChE, impedendone in questo modo le variazioni conformazionali e congelandola in una conformazione inattiva.



**Figura 3.** Substrutture dell'active site gorge della hAChE (codice PDB: 1B41):  $\Omega$ -loop (arancio); regioni dei residui catalitici: His (Magenta), Glu (bianco) e Ser (rosso); muro delle Gly (giallo); PAS (ciano). (A) Possibili modalità di binding del composto **3d** alla hAChE sovrapposte per C $\alpha$ : Bind\_1 (ligando: verde, proteina: chiara) e Bind\_2 (ligando: rosa, protein: scura). Il residuo W86 è mostrato con i volumi di VdW. Tutti gli eteroatomi sono colorati per tipo atomico (O= rosso; N= blu). I legami idrogeno sono mostrati con linee verdi tratteggiate. Per motivi di chiarezza sono stati omessi idrogeni e molecole d'acqua ad eccezione di quelli coinvolti in legami a idrogeno.

L'importanza delle fluttuazioni dell' $\Omega$ -loop nell'interazione con l'inibitore, viene confermata anche nella serie tioacridinica dei nuovi composti sviluppati (Schema 1), che manifestano un'elevata attività inibitoria sulla hAChE quando ne viene aumentata la lunghezza dello spaziatore alchilico di un unità metilenica, dal

lato della tetraidroacrdina (**3b**, rivolto al CAS) o da quello della tioacrdinica (**2d**, rivolto al PAS),<sup>63,70</sup> se viene mantenuta la funzione protonabile centrale (**2d** e **3b** vs **16**, Schema 1, 2 e Tabella 1).

Lo stesso set di composti mostra, invece, un differente andamento dell'attività inibitoria sulla *h*BuChE (**3b**>**16**>**2d**, Tabella 1), del tutto corenate con la minore flessibilità dell' $\Omega$ -loop di quest'enzima rispetto all'AChE. La sua maggiore vicinanza al PAS, infatti, determina una minore flessibilità della catena laterale del D74, che ancorando la funzione protonabile può consentire all'inibitore una buona interazione con il CAS solo quando vi è il linker a 4 metileni alla base del gorge.

Come precedentemente riportato, esiste un diverso gradiente di elettronegatività lungo l'*active site gorge* dell'AChE e della BuChE, che conferisce al gorge della prima un carattere più idrofilo e polarizzato. Coerentemente con questa osservazione, la sostituzione della funzione protonabile presente sul linker con un gruppo più ingombrante (**3b** vs **3a**), quale un gruppo acetilico, determina un calo di attività sulla *h*AChE e chiaramente spinge l'inibitore ad interagire con hot spots diversi lungo il gorge di questo enzima. Il composto **3a**, infatti, a causa della perdita della funzione protonabile a livello dello spaziatore alchilico, non è in grado di rafforzare l'interazione che D74 instaura con il network di Tyr appartenenti al motivo <sup>337</sup>YFLVY<sup>341</sup> del CAS, e con Y124 al PAS nella *h*AChE, e risulta meno attivo di un ordine di grandezza rispetto al composto **3b**.

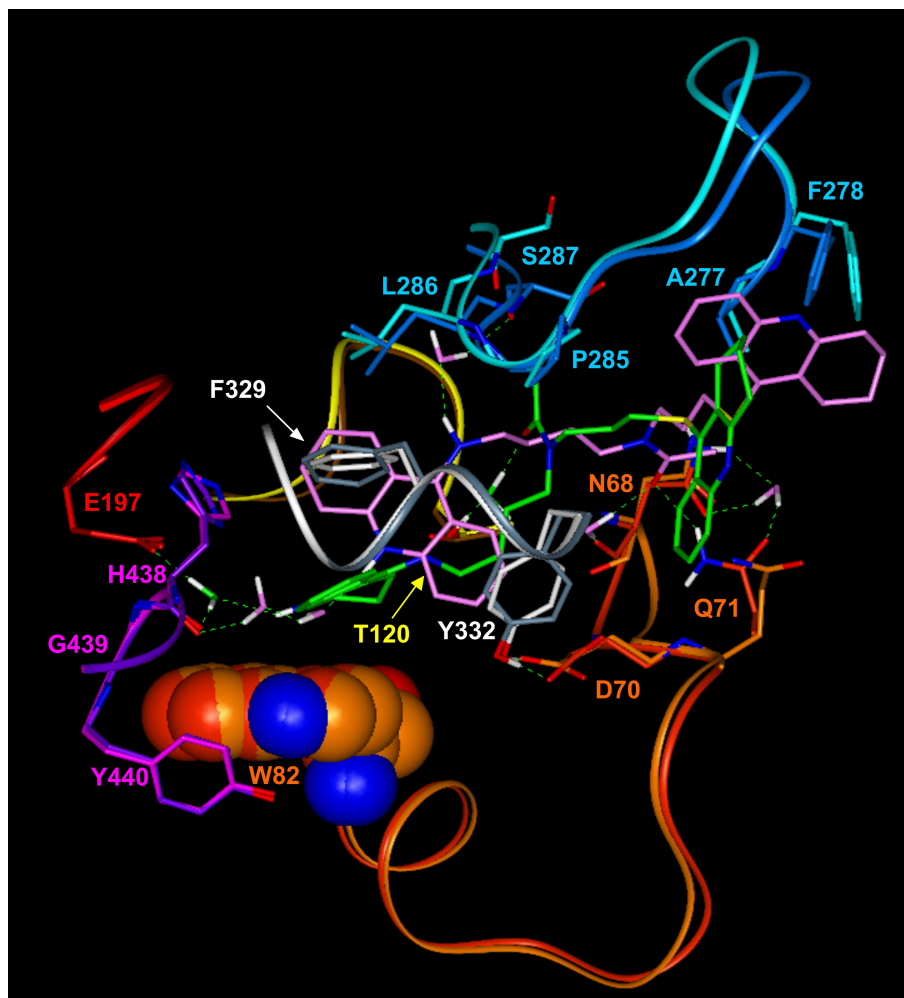
Coerentemente con la natura più idrofoba dell'*active site gorge* della *h*BuChE, il composto **3a** risulta essere, invece, il composto più potente e selettivo della serie

svilupata su questo enzima ( $K_i hBuChE = 270$  pM,  $hAChE/hBuChE$  ratio di 77, Tabella 1).

E' interessante notare come, date le maggiori dimensioni e la minore flessibilità del gorge della *hBuChE*, i nostri risultati di docking mostrino anche in questo caso due possibili modalità di binding (comparabili dal punto di vista energetico) del composto **3a** (Tabella 6 di Materiali e Metodi) con l'enzima. Esso, infatti, può interagire alternativamente o con il CAS ed il mid gorge (Bind 1 di Figura 4, ligando verde e Tabella 6 B) o con il mid gorge ed il PAS (Bind 2 di Figura 4, ligando rosa, Tabella 6 B).

L'esistenza di due possibili modalità di binding per il composto **3a** potrebbe essere dovuta alla sostituzione nella *hBuChE* della Y337 (*hAChE*) con un residuo di Ala (A328), che, causando la perdita dell'interazione di triplo stacking  $\pi$ - $\pi$  della porzione tacrinica con il CAS della *hBuChE*, determina la perdita di un punto/dominio di ancoraggio idrofobico fondamentale per il ligando (Figura 3 vs Figura 4).

Nella modalità di binding 1 (Bind 1 di Figura 4, ligando verde), il linker N4N(COMe)3S consente al composto **3a** di stabilire un'interazione  $\pi$ - $\pi$  due volte più forte con W82 rispetto al suo omologo invertito **2e** (Tabella 6) e di ancorarsi al mid-gorge mediante un legame a idrogeno indiretto con la S125 perdendo tuttavia l'interazione con i residui locati all'entrata del gorge.



**Figura 4.** Substrutture dell'active site gorge della hBuChE (codice PDB: 1P0I):  $\Omega$ -loop (arancio); regioni dei residui catalitici: His (Magenta), Glu (bianco) e Ser (rosso); muro delle Gly (giallo); PAS (ciano). Risultati del docking per le due possibili modalità di binding del composto **3a** alla hBuChE sovrapposte per C $\alpha$ : Bind\_1 (ligando: verde, proteina: chiara) e Bind\_2 (ligando: rosa, protein: scura). Il residuo W82 è mostrato con i volumi di VdW. Tutti gli eteroatomi sono colorati per tipo atomico (O= rosso; N= blu). I legami idrogeno sono mostrati con linee verdi tratteggiate. Per motivi di chiarezza sono stati omessi idrogeni e molecole d'acqua ad eccezione di quelli coinvolti in legami a idrogeno.

Al contrario, nella modalità di binding 2 (Bind 2 di Figura 4, ligando rosa), è presente una più forte interazione con i residui posti all'entrata del gorge, quali la F278 (appartenente al motivo  $_{278}\text{FVVPY}^{282}$ , Figura 2B) e la Q71, rispetto alle medesime interazioni stabilite dal composto **2e** con questi stessi residui (Tabella 6).



La sostituzione della porzione tiotacrinica di **3a** con una porzione tacrinica (**3c**, N4N(COMe)3N), capovolge il profilo di attività del ligando, rendendo il composto **3c** rispetto al composto **3a** 10 volte più potente sulla *hAChE*, diminuendo, tuttavia, leggermente la sua affinità per la *hBuChE* (Tabella 1). Questo effetto è spiegabile alla luce del fatto che la porzione tiotacrinica di **3a** essendo più idrofobica interagisce meglio con il sito periferico (F278 appartenente al motivo  $_{278}\text{FVVPY}^{282}$ ) della *hBuChE*<sup>63,70</sup> mentre la presenza di una seconda porzione tacrinica protonata, consente al composto **3c** di interagire più fortemente con il W286 della *hAChE*, attraverso un'interazione di stacking di tipo cation- $\pi$ .

Nonostante la presenza di una seconda porzione tacrinica protonata, il composto **3c** (N4N(COMe)3N) mantiene comunque un'attività comparabile a quella del composto **2e** (N3N(COMe)4S) sulla *hBuChE*. Ciò è dovuto al fatto che il composto **3c** può ancora posizionare, parimenti al composto **3a**, il linker a 4 metileni al CAS, interagendo così in maniera ottimale con gli aminoacidi presenti in questo sito e nel mid-gorge.

L'effetto di differenti catene N-alchiliche/alcheniliche sulla potenza e sulla selettività dei nuovi inibitori è stata valutata attraverso la sintesi di ligandi multisito analoghi di **3d**, quali i composti **3e-g** (*N*-Et, **3e**; *N*-allyl, **3f**; *N*-*b*-HEt, **3g**).

A tal proposito, è importante ricordare che la presenza di aminoacidi chiave lungo l'*active site gorge* della *hAChE* influisce sul: i) gradiente elettronegativo presente lungo di esso (*hAChE*>*hBuChE*), ii) sulla sua forma e sulle sue dimensioni e

iii) sulle fluttuazioni dell'enzima attraverso diversi stati conformazionali (*hAChE* > *hBuChE*).

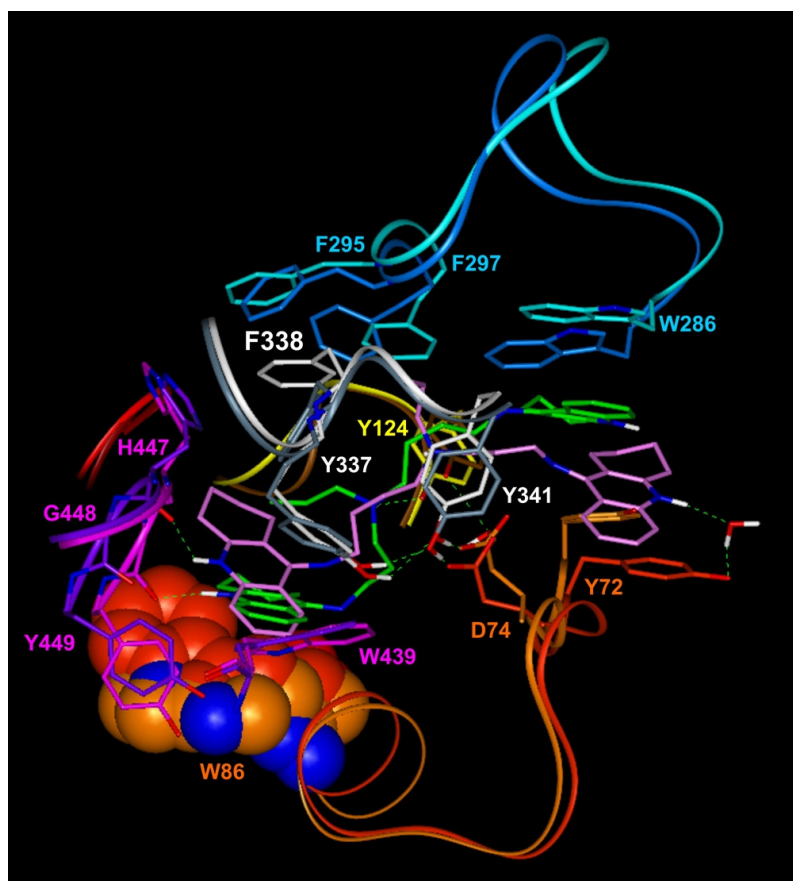
In particolare, le differenze cruciali presenti a livello del mid gorge e del PAS esistenti tra *hBuChE* e *hAChE*, quali le mutazioni dei residui A277/W286, F278/H287, G283/E292, P285/V294, L286/F295 (*hBuChE* vs *hAChE*), determinano la presenza di un solo motivo del tipo LxxLL nella *hBuChE*, il motivo  $_{278}\text{FVVPY}^{282}$  (Figura 2A vs Figura 2B) e conferiscono al gorge di questo enzima una natura più idrofobica ed una forma più definita che consente l'accomodazione di gruppi idrofobici più ingombranti ma che devono comunque essere facilmente adattabili.

In accordo con queste osservazioni, mentre la sostituzione del gruppo metilico di **3d** con un gruppo etilico in **3e** determina un aumento di 2 volte dell'affinità sulla *hBuChE* ed anche la sua sostituzione con un gruppo  $\beta$ -idrossietilico nel composto **3g** consente di mantenere ancora un'elevata potenza, l'introduzione di un gruppo allilico (**3f** vs **3e**, Tabella 1) determina un drammatico calo di 10 volte dell'attività sulla *hBuChE*.

D'altro canto però, il composto **3f** conserva un'eccellente potenza inibitoria ed un'ottima selettività per l'AChE ( $K_i hAChE = 84.75 \text{ pM}$ ,  $K_i hBuChE = 4191 \text{ pM}$  con una ratio *hAChE/hBuChE* di 0.02), grazie alle interazioni  $\pi$ - $\pi$  che questo gruppo riesce ad instaurare con gli hot spots identificati. Il composto **3f**, infatti, posizionando il linker a 3 metileni verso il CAS, accomoda perfettamente il suo gruppo allilico nella tasca aromatica della *hAChE* costituita dal motivo  $_{337}\text{YFLVY}^{341}$ , sostituendo Y337 nello stacking con il W86 e causando lo spostamento della catena laterale di

Y337 verso Y341 (Bind\_2, Figura 5, ligando verde). Questo arrangiamento strutturale, assistito da un legame idrogeno con la Y124 del muro delle Gly, rafforza fortemente il network Y124(PAS)-Y337(CAS)-Y341(PAS)-D74( $\Omega$ -loop).

La porzione tetraidroacridinica, inoltre, è in grado di stabilire un triplo stacking  $\pi$ - $\pi$  con W286 e Y72 al PAS. E' chiaro che, l'interazione simultanea di **3f** con Y341, Y124, Y72, e W286 determina la chiusura del hot spot del PAS intorno al ligando.



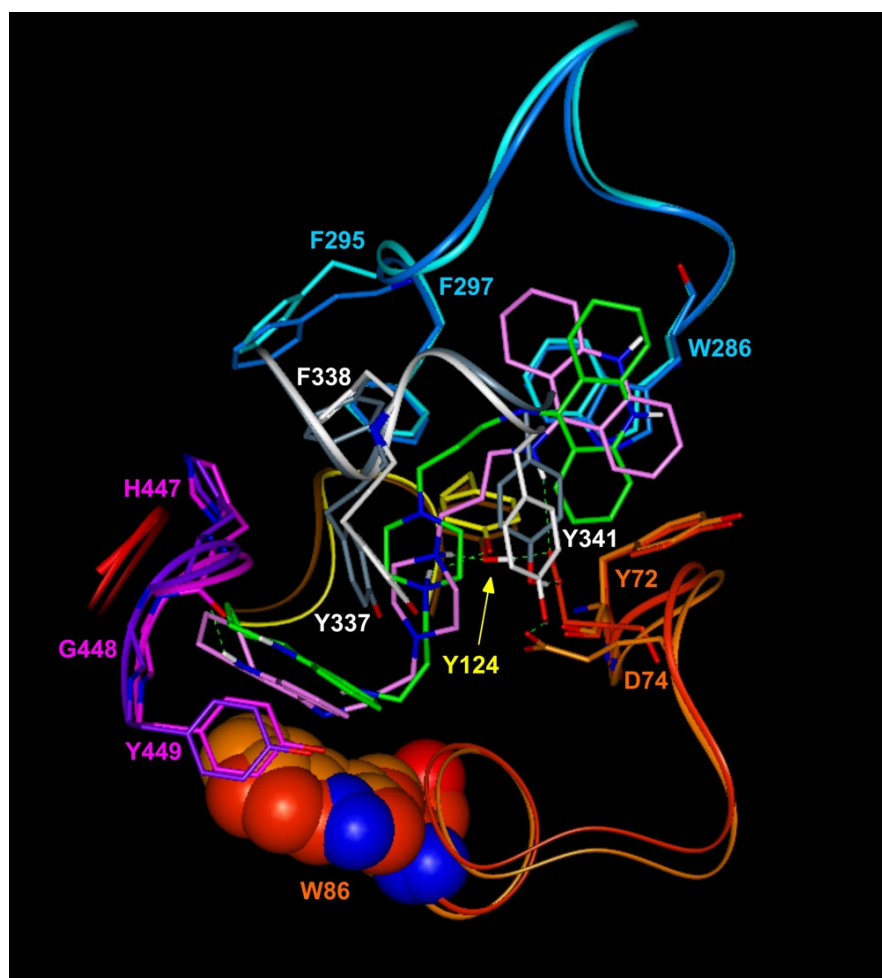
**Figura 5.** Risultati del docking per le due possibili modalità di binding del composto **3f** alla hAChE sovrapposte per C $\alpha$ : Bind\_1 (ligando: verde, proteina: chiara) e Bind\_2 (ligando: rosa, proteina: scura). Il residuo W86 è mostrato con i volumi di VdW. Tutti gli eteroatomi sono colorati per tipo atomico (O= rosso; N= blu). I legami idrogeno sono mostrati con linee verdi tratteggiate. Per motivi di chiarezza sono stati omessi idrogeni e molecole d'acqua ad eccezione di quelli coinvolti in legami a idrogeno.

Inoltre, la presenza di hot spots aromatici multipli lungo il gorge della hAChE (Tabella 4) e le fluttuazioni dell' $\Omega$ -loop (D74), consentono un'ulteriore modalità di

binding per il composto **3f** nell'active site gorge della *hAChE* (energeticamente comparabile con il precedente, Tabella 6) che prevede il posizionamento del linker a 4 metileni lungo il PAS (Bind\_1, Figura 5, ligando rosa).

L'introduzione di un anello *N1,N4*-bis-(3-aminopropil)piperazinico nel linker alchilico risulta in un composto che è estremamente potente e selettivo per la *hAChE* (**3h**,  $K_i hAChE = 136$  pM, Tabella 1) confermando la presenza di hot spots fluttuanti e funzionali lungo il gorge di questo enzima. Il calcolo del pKa per questo composto indica che, a pH fisiologico (7.2), solo un atomo di azoto dell'anello piperazinico è protonato, nonostante il valore singolo del pka delle due funzioni amminiche terziarie sia identico ( $7.03 \pm 0.70$ ). Gli studi di docking flessibile evidenziano la possibilità per **3h** di stabilire interazioni favorevoli con D74 ( $\Omega$ -loop) ed il network di Tyr presenti negli hot spots del gorge dell'AChE, posizionando l'atomo di azoto protonato della piperazina molto vicino o al CAS o al PAS (Bind\_1 e Bind\_2, rispettivamente; Figura 6 e Tabella 6).

La presenza, quindi, di due siti di binding adiacenti (gli hot spots del CAS e del PAS, Figura 2A) determinano l'instaurarsi anche per il composto **3h**, similamente a **3d** e **3f**, di interazioni favorevoli, confermando la reciproca adattabilità dell'enzima e del ligando.



**Figura 6.** Substrutture dell'active site gorge della *hAChE* (codice PDB: 1B41):  $\Omega$ -loop (arancio); regioni dei residui catalitici: His (Magenta), Glu (bianco) e Ser (rosso); muro delle Gly (giallo); PAS (ciano). Risultati del docking per le due possibili modalità di binding del composto **3h** alla *hBuChE* sovrapposte per C $\alpha$ : Bind 1 (protone al CAS, ligando: verde, proteina: chiara) e Bind 2 (protone al PAS, ligando: rosa, protein: scura). Il residuo W86 è mostrato con i volumi di VdW. Tutti gli eteroatomi sono colorati per tipo atomico (O= rosso; N= blu). I legami idrogeno sono mostrati con linee verdi tratteggiate. Per motivi di chiarezza sono stati omessi idrogeni e molecole d'acqua ad eccezione di quelli coinvolti in legami a idrogeno.

**Tabella 6 A:** Energia d'interazione non bond per i complessi della *hAChE* ottenuti dai calcoli di docking.

Energia Molecola-Molecola	<i>hAChE</i>		
	vdW	Coul	Tot
<b>3d</b> Bind_1 <sup>a</sup>	-385,131	-60,003	-445,134
<b>3d</b> Bind_2 <sup>b</sup>	-381,796	-63,11	-444,906
<b>3f</b> Bind_1 <sup>a</sup>	-63.038	-365.966	-429.004

<b>3f</b> Bind_2 <sup>b</sup>	-63.54	-377.311	-440.851
<b>3h</b> Bind_1 <sup>c</sup>	-352,979	-62,167	-415,146
<b>3h</b> Bind_2 <sup>d</sup>	-341,5	-64,582	-406,082

<sup>a</sup> Linker a 4-metileni verso il CAS; <sup>b</sup> Linker a 3 metileni verso il CAS; <sup>c</sup> Azoto protonato verso il CAS; <sup>d</sup> Azoto protonato verso il PAS.

**Tabella 6 B:** Energia d'interazione non bond per i complessi della *h*BuChE ottenuti dai calcoli di docking.

<b>2e/hBuChE</b>			
<b>Energia Molecola-Molecola</b>	<b>vdW</b>	<b>Coul</b>	<b>Tot</b>
	-42.619	-39.673	-82.292
<b>Energia Monomero-Monomero</b>	<b>vdW</b>	<b>Coul</b>	<b>Tot</b>
W82	-3,103	-0,088	-3,191
F278	-2,149	0,012	-2,037
Q71	-	-	-
<b>3a/hBuChE_Bind 1<sup>a</sup></b>			
<b>Energia Molecola-Molecola</b>	<b>vdW</b>	<b>Coul</b>	<b>Tot</b>
	-46.018	-52.452	-98.470
<b>Energia Monomero-Monomero</b>	<b>vdW</b>	<b>Coul</b>	<b>Tot</b>
W82	-5,366	-1,004	-6,370
F278	-	-	-
Q71	-1,229	0,633	-0,597
<b>3a/hBuChE_Bind 2<sup>b</sup></b>			
<b>Energia Molecola-Molecola</b>	<b>vdW</b>	<b>Coul</b>	<b>Tot</b>
	-38.993	-44.368	-83.361
<b>Energia Monomero-monomero</b>	<b>vdW</b>	<b>Coul</b>	<b>Tot</b>
W82	-0,737	0,544	-0,192
F278	-2,733	-0,178	-2,911
Q71	-1,116	-1,104	-2,220

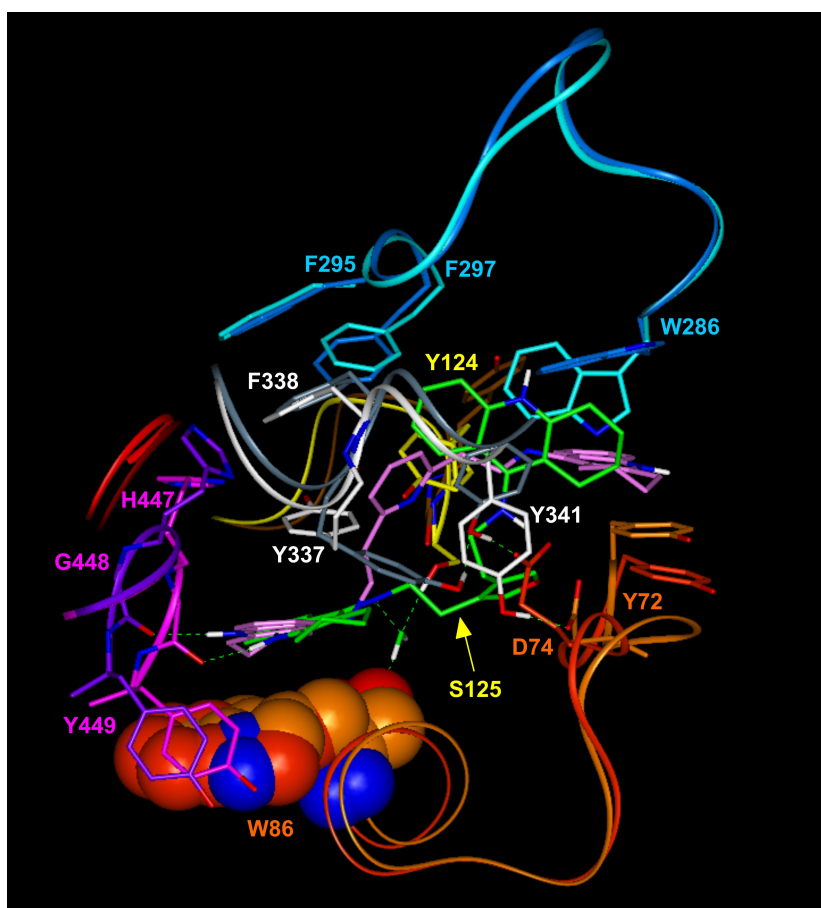
<sup>a,b</sup> Modalità di binding indicate nel testo.

Nei nuovi composti progettati è stato inoltre valutato l'effetto su potenza e selettività esercitato negli omodimeri della tacrina da linker di natura alchilarilalchilici (**3i-m**).

In linea generale, i composti **3i-m** mostrano una più bassa potenza inibitoria sulla *hAChE*, se comparati con gli analoghi spermidinici **3d-g**, mentre mantengono un'affinità nel range nanomolare per la *hBuChE*, che risulta in una ratio di selettività da 0.12 a 1.86. Questo andamento delle SAR sottolinea ulteriormente l'importanza della flessibilità conformazionale del ligando per l'interazione con la *hAChE*.

In particolare, sebbene la presenza di un anello piridinico a livello del linker nel composto **3j** sia responsabile di un'elevata attività e selettività per la *hAChE* (Tabella 1), questo composto, a causa comunque della presenza di un linker più corto e quindi della sua diminuita adattabilità strutturale, risulta 65 volte meno potente di **3d**.

In accordo con ciò, i nostri risultati di docking sul complesso **3j/hAChE** (Figura 6, ligando rosa) mostrano che il composto **3j**, sebbene sia comunque in grado di stabilire interazioni aromatiche favorevoli con i residui amminoacidi del motivo  $^{337}\text{YFLVY}^{341}$ , orientando il suo azoto piridinico nella stessa posizione dell'azoto protonato del composto **3d** nella modalità di binding 1 (Figura 1, ligando verde), non riesce a raggiungere in maniera ottimale e contemporaneamente CAS e PAS, il che ne comporta una minore capacità di opporsi ai movimenti reciproci di questi siti, giustificando così la sua minore attività.



**Figura 7.** Substrutture dell'active site gorge della hAChE (codice PDB: 1B41):  $\Omega$ -loop (arancio); regioni dei residui catalitici: His (Magenta), Glu (bianco) e Ser (rosso); muro delle Gly (giallo); PAS (ciano). Risultati dei docking per i complessi **3j**/hAChE (ligando: verde, proteina: chiara) e **3m**/hAChE (ligando: rosa, proteina: scura) sovrapposti per C $\alpha$ . Il residuo W86 è mostrato con i volumi di VdW. Tutti gli eteroatomi sono colorati by atom (O= rosso; N= blu). I legami idrogeno sono mostrati con linee verdi tratteggiate. Per motivi di chiarezza sono stati omessi idrogeni e molecole d'acqua ad eccezione di quelli coinvolti in legami a idrogeno.

Il profilo di selettività *hAChE/hBuChE* viene, invece, capovolto quando lo spaziatore alchilico viene sostituito da un sostituito (1,3-fenilen)dietanamino nel composto **3i**, che risulta leggermente più potente sulla *hBuChE* ( $K_{ihAChE}$  =1718 pM,  $K_{ihBuChE}$  = 924 pM).

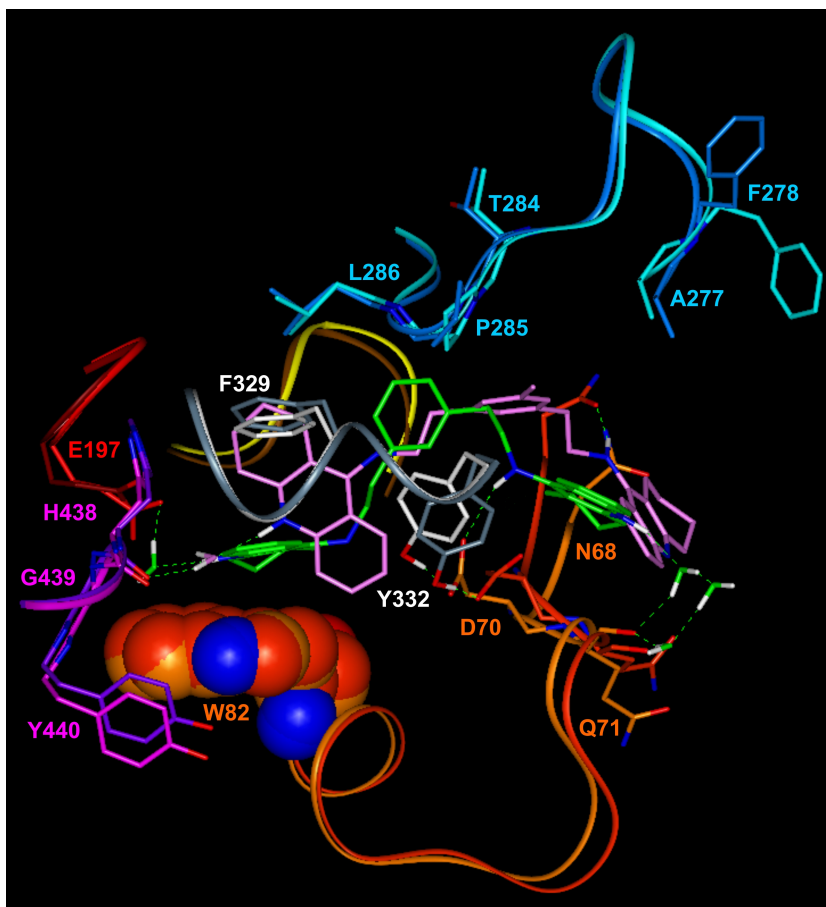


D'altro canto però, l'affinità per la *h*BuChE diminuisce quando l'attacco in meta del gruppo fenilico di **3i** viene sostituito con un attacco in para nel composto **3k** (*Ki**h*BuChE = 13860 pM).

Come discusso precedentemente, la mutazione di alcuni amminoacidi chiave nel gorge della *h*BuChE determina un minor grado di flessibilità conformazionale dell'*active site gorge* di questo enzima se comparato a quello della *h*AChE (Figura 2B, D).

In particolare, la presenza nella *h*BuChE del residuo di P285 in stretta vicinanza al cluster aromatico di tipo SH3 formato dai residui F329 e Y332 (Tabella 4 C), presenti nella regione del glu catalitico, e di W430, nella regione dell'istidina catalitica, conferisce una rigidità conformazionale al canale. Come illustrato in Figura 8 (ligando verde), l'anello fenilico 1,3-disostituito di **3i** (*Ki**h*BuChE = 924 pM) è in grado di adattarsi meglio a questo sito dell'enzima: i) interagendo con F329 e Y332, ii) mantenendo una buona interazione di stacking  $\pi$ - $\pi$  con W82 (CAS) e iii) stabilendo un H-Bond con D70 ( $\Omega$ -loop).

L'anello fenilico con attacco in para di **3k** (*Ki**h*BuChE = 13860 pM) e quello sostituito in posizione 2 con un metile di **3l** (*Ki**h*BuChE = 5040 pM) (Figura 7, ligando rosa), invece, mal si adattano a questa regione dell'enzima, spingendo conseguentemente, il ligando verso il PAS e riducendone l'interazione con i residui del CAS.



**Figura 8.** Substrutture dell'active site gorge della hBuChE (codice PDB: 1P0I):  $\Omega$ -loop (arancio); regioni dei residui catalitici: His (Magenta), Glu (bianco) e Ser (rosso); muro delle Gly (giallo); PAS (ciano). Risultati dei docking per i complessi **3i**/hBuChE (ligando: verde, proteina: chiara) e **3l**/hBuChE (ligando: rosa, proteina: scura) sovrapposti per C $\alpha$ . Il residuo W82 è mostrato con i volumi di VdW. Tutti gli eteroatomi sono colorati by atom (O= rosso; N= blu). I legami idrogeno sono mostrati con linee verdi tratteggiate. Per motivi di chiarezza sono stati omessi idrogeni e molecole d'acqua ad eccezione di quelli coinvolti in legami a idrogeno.

Un andamento differente delle relazioni struttura-attività si può invece osservare per questi composti sulla hAChE (**3i**, **3k** e **3l**, Tabella 1), coerentemente con la presenza di più hot spots presenti lungo il gorge di questo enzima e con la sua più elevata flessibilità conformazionale.

A causa della più forte polarizzazione dell'*active site gorge* della hAChE, inoltre, la potenza dei ligandi viene maggiormente condizionata dalle proprietà elettroniche dell'anello aromatico. Infatti, l'introduzione di un anello furanico nel

composto **3m** conduce ad una diminuzione di 14 volte dell'affinità per la *hAChE* rispetto a **3j** (Tabella 1 e Figura 6). Come ci si aspettava, la natura più elettronegativa dell'anello furanico, e la sua incapacità ad accettare/donare legami a idrogeno, mal si associa al gradiente elettronegativo e alla composizione amminoacidica dell'*active site gorge* dei due enzimi e la sua attività inibitoria diminuisce coerentemente con la differenza di gradiente elettronegativo tra i gorge della *hAChE* e della *hBuChE* (*hAChE*>*hBuChE*). Come illustrato in Figura 6 e riportato in Tabella 3F, i nostri risultati di docking sul complesso **3m**/*hAChE* mostrano uno spostamento del D74 dell' $\Omega$ -loop e la stabilizzazione della posizione nativa (apoenzima) della catena laterale di W286.

### 3.5 CONCLUSIONI

L'osservazione che le fluttuazioni conformazionali giochino un ruolo fondamentale nel funzionamento di una proteina suggerisce l'esistenza di residui amminoacidi chiave criticamente associati a tali fluttuazioni strutturali.

In entrambe le famiglie di colinesterasi umane, il mio lavoro di ricerca ha condotto all'identificazione di specifici punti di contatto nella proteina (hot spots), responsabili delle fluttuazioni e del funzionamento di questi enzimi. Tali residui svolgono un ruolo cruciale nella modulazione del network cooperativo tra le sub-strutture che compongono l'*active site gorge*. I risultati ottenuti hanno guidato la progettazione razionale di nuovi ligandi.

A tale scopo, quindi, è stata eseguita un'approfondita analisi bioinformatica che ha identificato domini di interazione proteina-proteina, consentendo di sviluppare nuovi inibitori della *hAChE* e della *hBuChE* estremamente potenti e potenzialmente in grado di modulare le loro funzioni classiche e non classiche.

Il mio lavoro di ricerca, inoltre, ha consentito, attraverso l'analisi delle strutture dell'enzima e dei suoi movimenti, l'ottimizzazione della procedura di docking flessibile applicata.

Al fine di calcolare i movimenti conformazionali indotti dal legame degli inibitori di residui chiave collocati in regioni differenti del gorge, sono state analizzate tutte le strutture cristallografiche delle colinesterasi disponibili nella PDB e i movimenti in esse presenti dei suddetti residui sono stati calcolati e tabulati.

Ciò ha condotto alla dimostrazione che nella *hAChE*, in seguito al legame con l'inibitore, si verificano movimenti concertati di specifici residui amminoacidici presenti nel CAS (Y337), nel mid gorge (D74 e Y341) e nel PAS (W286) dell'enzima che risultano essere strettamente correlati alla potenza ed alla modalità di binding dell'inibitore.

In particolare, è stato dimostrato che esiste una stretta relazione tra la potenza dell'inibitore e il movimento da esso indotto del Trp286 del PAS.

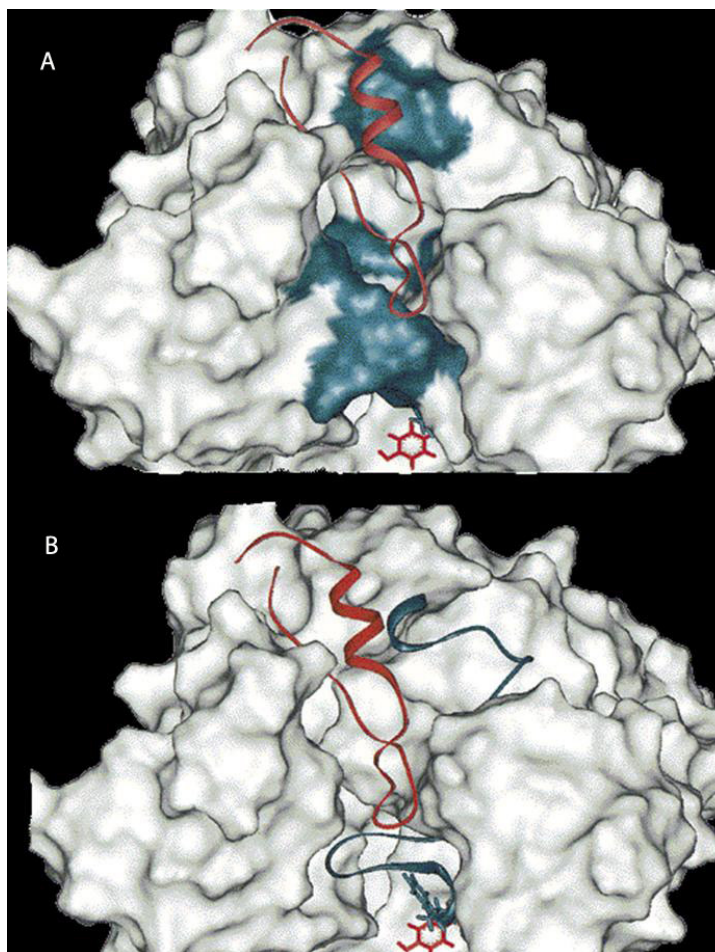
I risultati ottenuti hanno consentito l'implementazione della strategia di progettazione, che ha portato allo sviluppo di una serie di inibitori competitivi estremamente potenti ed altamente flessibili caratterizzati da valori di  $K_i$  da alti a bassi intervalli picomolari.

In particolare, il composto **3d** è stato trovato essere il più potente e selettivo inibitore della *hAChE* ad oggi conosciuto ( $K_i hAChE = 11.8$  pM,  $K_i hBuChE = 819$  pM;  $hAChE/hBuChE$  ratio = 0.01).

Questo approccio di progettazione di inibitori delle funzioni classiche e non classiche delle colinesterasi attraverso il legame con specifici domini di interazione proteina-proteina, può aprire la strada per lo sviluppo di nuovi potenziali agenti per il trattamento della Malattia di Alzheimer.

## **4. PROSPETTIVE**

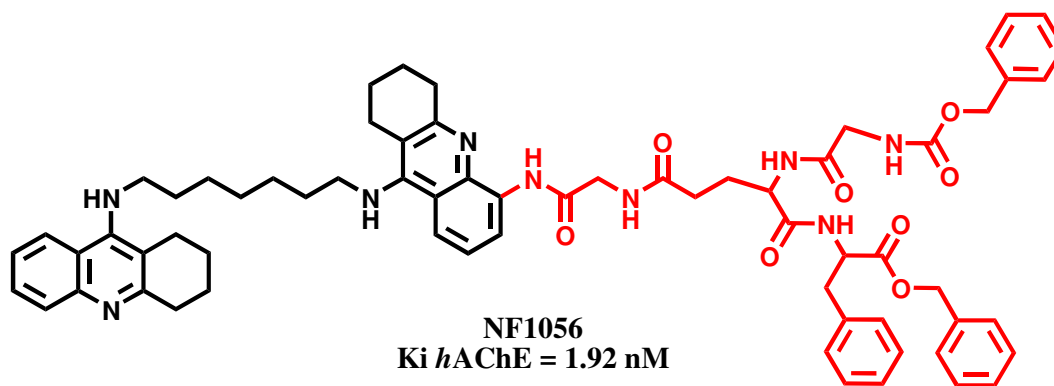




**Figura 2.** (A) Complementarietà delle superfici di TcAChE (blu) e Aβ (ribbon rosso scuro) nel complesso da essi formato. (B) I residui Y70 (rosso) e W279( verde scuro), principalmente coinvolti nell'interazione, sono mostrati in stick.

Alla luce di queste conoscenze, partendo dall'analisi delle interazioni instaurate dalla Fasciculina II con il PAS della *hAChE* (codice PDB 1B41), alla struttura del composto **15** è stata aggiunta una porzione peptidica accessoria direttamente attaccata ad una delle due porzioni tacriniche (NF1056, Schema 1), affinché essa sporgendo dal gorge potesse interagire direttamente con gli amminoacidi del PAS coinvolti nel legame con Aβ.

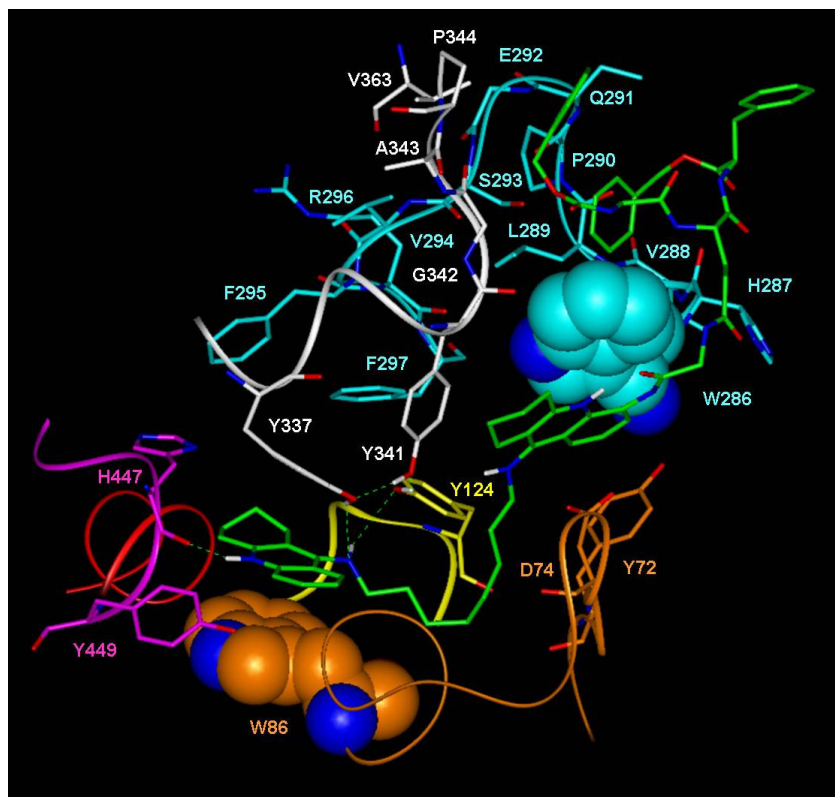




**Schema 1.** Struttura ed attività del composto NF1056.

Il composto NF1056 mostra una buona attività inibitoria sulla *hAChE* e il risultato del docking flessibile indica che NF1056 è in grado di indurre il movimento conformazionale del W286 osservato per i composti precedentemente sviluppati (Figura 3) e di stabilire analoghe interazioni con gli hot spots individuati lungo l'active site gorge dell'enzima.

Il risultato ottenuto valida ulteriormente la strategia di progettazione illustrata ed apre la strada allo sviluppo di inibitori altamente selettivi per la conformazione patologica dell'AChE coinvolta nei processi neurodegenerativi che sottendono all'AD.



**Figura 3.** Risultato dei docking per il complesso NF1056/hAChE (ligando: verde). I residui W86 e W286 sono mostrati con i volumi di VdW. Tutti gli eteroatomi sono colorati by atom (O= rosso; N= blu). I legami idrogeno sono mostrati con linee verdi tratteggiate. Per motivi di chiarezza sono stati omessi idrogeni e molecole d'acqua ad eccezione di quelli coinvolti in legami a idrogeno.

## **5. RIFERIMENTI**

- 
- (1) Amaral MD. 2004. *J. Mol. Neurosci.* 23:41–48
  - (2) Lomas DA, Carrell RW. 2002. *Nat. Rev. Genet.* 3:759–684.
  - (3) Westermarck P, Benson MD, Buxbaum JN, Cohen AS, Frangione B, et al. 2005. *Amyloid* 12:1–4
  - (4) Cohen F. E.; Kelly J. W. Therapeutic approaches to protein misfolding diseases. *Nature*, 2003, 426, 905-909
  - (5) Dickson, D.W. Neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease: a perspective from longitudinal clinicopathological studies. *Neurobiol. Aging* 18, S21–S26 (1997).
  - (6) Braak, H. & Braak, E. Evolution of neuronal changes in the course of Alzheimer's disease. *J. Neural Transm. Suppl.* 53, 127–140 (1998).
  - (7) Mattson M.P. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature*, 2004, 430, 631-640.
  - (8) Hardy, J. Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* 20, 154–159 (1997).
  - (9) Mattson, M. P. Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. *Physiol. Rev.* 77, 1081–1132 (1997).
  - (10) Butterfield, D. A. et al. Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid beta-peptide. *Trends Mol. Med.* 7, 548–554 (2001).
  - (11) Bush, A. I., Masters, C. L. & Tanzi, R. E. Copper, beta-amyloid, and Alzheimer's disease: tapping a sensitive connection. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 100, 11193–11194 (2003).
  - (12) Smith, M. A. et al. Iron accumulation in Alzheimer disease is a source of redox-generated free radicals. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 94, 9866–9868 (1997).
  - (13) Bush AI. The metallobiology of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* 2003; 26(4):207-14.
  - (14) Lovell, M. A., Robertson, J. D., Teesdale, W. J., Campbell, J. L., and Markesbery, W. R. (1998) *J. Neurol. Sci.* 158(1), 47-52
  - (15) Smith, M. A., Harris, P. L., Sayre, L. M., and Perry, G. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94(18), 9866-9868.

- 
- (16) Kontush, A., Berndt, C., Weber, W., Akopyan, V., Arlt, S., Schippling, S., and Beisiegel, U. (2001) Amyloid- $\beta$  is an antioxidant for lipoproteins in cerebrospinal fluid and plasma, *Free Radical Biol. Med.* 30, 119-128.
- (17) Bishop, G. M., and Robinson, S. R. (2004) The amyloid paradox: amyloid- $\beta$ -metal complexes can be neurotoxic and neuroprotective, *Brain Pathol.* 14, 448-452.
- (18) Maynard, C. et al. (2002) Overexpression of Alzheimer's disease b-amyloid opposes the age-dependent elevations of brain copper and iron levels. *J. Biol. Chem.* 277, 44670–44676
- (19) Curtain, C. et al. (2001) Alzheimer's disease amyloid binds Cu and Zn to generate an allosterically-ordered membrane-penetrating structure containing SOD-like subunits. *J. Biol. Chem.* 276, 20466–20473
- (20) Curtain, C.C. et al. (2003) Metal ions, pH and cholesterol regulate the interactions of Alzheimer's disease amyloid-b peptide with membrane lipid. *J. Biol. Chem.* 278, 2977–2982
- (21) Miura T, Suzuki K, Kohata N, Takeuchi H. Metal binding modes of Alzheimer's amyloid beta-peptide in insoluble aggregates and soluble complexes. *Biochemistry.* 2000 Jun 13;39(23):7024-31.
- (22) Rogers, J. et al. (2002) An iron-responsive element type II in the 5' untranslated region of the Alzheimer's amyloid precursor protein transcript. *J. Biol. Chem.* 277, 45518–45528
- (23) Nakamura M, Shishido N, Nunomura A, Smith MA, Perry G, Hayashi Y, Nakayama K, Hayashi T. Three Histidine Residues of Amyloid-beta Peptide Control the Redox Activity of Copper and Iron. *Biochemistry.* 2007 Nov 6;46(44):12737-12743.
- (24) Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. C. (1984) Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease, *Biochem. J.* 219, 1-14.
- (25) Giulian, D. et al. (1998) The HHQK domain of b-amyloid provides a structural basis for the immunopathology of Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* 273, 29719–29726.
- (26) Atwood, C.S. et al. (1998) Dramatic aggregation of Alzheimer Ab by Cu(II) is induced by conditions representing physiological acidosis. *J. Biol. Chem.* 273, 12817–12826
- (27) Atwood, C.S. et al. (2000) Characterization of copper interactions with Alzheimer Ab peptides - identification of an attomolar affinity copper binding site on Ab1-42. *J. Neurochem.* 75, 1219–1233

- 
- (28) Opazo, C. et al. (2002) Metalloenzyme-like activity of Alzheimer's disease b-amyloid: Cu-dependent catalytic conversion of dopamine, cholesterol and biological reducing agents to neurotoxic H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *J. Biol.Chem.* 277, 40302–40308.
- (29) Head, E. et al. (2001) Oxidation of Ab and plaque biogenesis in Alzheimer's disease and Down syndrome. *Neurobiol. Dis.* 8, 792–806.
- (30) Sayre, L.M. et al. (2000) In situ oxidative catalysis by neurofibrillary tangles and senile plaques in Alzheimer's disease: a central role for bound transition metals. *J. Neurochem.* 74, 270–279.
- (31) Tickler AK, Smith DG, Ciccotosto GD, Tew DJ, Curtain CC, Carrington D, Masters CL, Bush AI, Cherny RA, Cappai R, Wade JD, Barnham KJ. Methylation of the imidazole side chains of the Alzheimer disease amyloid-beta peptide results in abolition of superoxide dismutase-like structures and inhibition of neurotoxicity. *J Biol Chem.* 2005 Apr 8;280(14):13355-63.
- (32) Lockhart A, Ye L, Judd DB, Merritt AT, Lowe PN, Morgenstern JL, Hong G, Gee AD, Brown J. Evidence for the presence of three distinct binding sites for the thioflavin T class of Alzheimer's disease PET imaging agents on beta-amyloid peptide fibrils. *J Biol Chem.* 2005, 280(9):7677-84
- (33) Tamasi G, Chiasserini L, Savini L, Sega A, Cini R. Structural study of ribonucleotide reductase inhibitor hydrazones. Synthesis and X-ray diffraction analysis of a copper(II)-benzoylpyridine-2-quinolinyl hydrazone complex. *J. Inorg. Biochem.* 2005, 99(6):1347-59
- (34) Pearson R.G. Hard and Soft Acids and Bases. *JACS* 1963, 85, 3533-3539
- (35) Nichols L, Pike VW, Cai L, Innis RB. Imaging and in vivo quantitation of beta-amyloid: an exemplary biomarker for Alzheimer's disease? *Biol Psychiatry.* 2006, 59(10):940-7.
- (36) Heutink P. Untangling tau-related dementia. *Hum Mol Genet.* **2000**, 9(6):979-86.
- (37) Giacobini, E. Cholinergic functions in Alzheimer's disease. *Int. J. Geriatr. Psychiatry*, **2003**, 18, S1-S5, and references cited therein.
- (38) Greig, N.H.; Utsuki, T.; Yu, Q.-S.; Zhu, X.; Holloway, H.W.; Perry, T.; Lee, B.; Ingram, D.K.; Lahiri, D.K. A new therapeutic target in Alzheimer's disease treatment: attention to butyrylcholinesterase. *Current Medical Research and Opinion*, **2001**, 17, 1-6.
- (39) Taylor P, Radic Z. The cholinesterases: from genes to proteins. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* **1994**;34:281-320

- 
- (40) NACHon, F.; Ehret-Sabatier, L.; Loew, D.; Colas, C.; van Dorsselaer, A. Trp82 and Tyr332 are involved in two quaternary ammonium binding domains of human butyrylcholinesterase as revealed by photoaffinity labeling with [3H]DDF. *Biochemistry* **1998**, 37, 10507-10513.
- (41) Pang, Y.-P.; Quiram, P.; Jelacic, T.; Hong, F. Highly potent, selective, and low cost bis-tetrahydroaminacrine inhibitors of acetylcholinesterase. Steps toward novel drugs for treating Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* 1996, 271, 23646-23649.
- (42) Carlier, P.R.; Chow, E.S.-H.; Han, Y.; Liu, J.; El Yazal, J.; Pang, Y.-P. Heterodimeric tacrine-based acetylcholinesterase inhibitors: investigating ligand-peripheral site interactions. *J. Med. Chem.* 1999, 42, 4225-4231, and references cited therein
- (43) Mesulam, M. Neuroanatomy of cholinesterases in the normal human brain and in Alzheimer's disease. In *Cholinesterase and cholinesterase inhibitors*; Giacobini E., Ed.; Martin Donitz, London, 2000; pp 121-137
- (44) Mack, A.; Robitzki, A. The Key Role of Butyrylcholinesterase during neurogenesis and neural disorders: an antisense-5'-butyrylcholinesterase-DNA study. *Progress Neurobiol.* 2000, 60, 607-628, and references cited therein.
- (45) Silman, I; Sussman, J.L. Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2005; 5, 293-302.
- (46) Giacobini E. In: Meyer EM, Simpkins JW, Yamamoto J, Crews FT (Eds). *Treatment of Dementias, A New Generation of Progress (Advances in Behavioral Biology, vol. 40)*. Plenum Press, New York: 1992, pp.19-34
- (47) Reyes, A.E.; Chacon, M.A.; Dinamarca, M.C.; Cerpa, W.; Morgan, C.; Inestrosa, N.C. Acetylcholinesterase-A $\beta$  complexes are more toxic than A $\beta$  fibrils in rat hippocampus: effect on rat beta-amyloid aggregation, laminin expression, reactive astrogliosis, and neuronal cell loss. *Am. J. Pathol.* 2004, 164, 2163-2174.
- (48) Alvarez, A., Opazo, C., Alarcón, R., Garrido, J., and Inestrosa, N. C. Acetylcholinesterase promotes the aggregation of amyloid-beta-peptide fragments by forming a complex with the growing fibrils. *J. Mol. Biol.* (1997) 272, 348-361.

- 
- (49) Inestrosa, N. C., Alvarez, A., Pe´rez, C. A., Moreno, R. D., Vicente, M., Linker, C., Casanueva, O. I., Soto, C., and Garrido, J. Acetylcholinesterase Accelerates Assembly of Amyloid- $\beta$ -Peptides into Alzheimer's Fibrils: Possible Role of the Peripheral Site of the Enzyme. *Neuron* 1996 16, 881-891.
- (50) Reyes, A. E., Perez, D., Alvarez, A., Garrido, J., Gentry, M.K., Doctor, B. P., and Inestrosa, N. C. A Monoclonal Antibody against Acetylcholinesterase Inhibits the Formation of Amyloid Fibrils Induced by the Enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997 232, 652-655.
- (51) De Ferrari GV, Canales MA, Shin I, Weiner LM, Silman I, Inestrosa NC. A structural motif of acetylcholinesterase that promotes amyloid beta-peptide fibril formation. *Biochemistry*. 2001 Sep 4;40(35):10447-57.
- (52) Inestrosa, N.C.; Sagal, J.P.; Colombres, M. Acetylcholinesterase interaction with Alzheimer amyloid beta. *Subcell Biochem.* 2005, 38, 299-317.
- (53) Guillozet AL, Smiley JF, Mash DC, Mesulam MM. Butyrylcholinesterase in the life cycle of amyloid plaques. *Ann Neurol.* 1997;42(6):909-18.
- (54) Giacobini, E.; Spiegel, R.; Enz, A.; Veroff, A.E.; Cutler, N.R. Inhibition of acetyl- and butyrylcholinesterase in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease by rivastigmine: correlation with cognitive benefit. *J. Neural Transmission* 2002 109, 1053-1065.
- (55) Perrier, A.L.; Massoulie, J.; Krejci, E. PRiMA - The Membrane Anchor of Acetylcholinesterase in the Brain. *Neuron*, 2002, 33, 275-285.
- (56) a) Shi, J.; Boyd, A.E.; Radic, Z.; Taylor, P. Reversibly bound and covalently attached ligands induce conformational changes in the omega loop, Cys69-Cys96, of mouse acetylcholinesterase. *J Biol. Chem.* 2001, 276, 42196-42204; b) Bourne, Y.; Radic, Z.; Sulzenbacher, G.; Kim, E.; Taylor, P.; Marchot, P. Substrate and Product Trafficking through the Active Center Gorge of Acetylcholinesterase Analyzed by Crystallography and Equilibrium Binding. *J. Biol. Chem.* 2006, 281, 29256-29267.
- (57) Silman, I; Sussman, J.L. Acetylcholinesterase: 'classical' and 'non-classical' functions and pharmacology. *Curr. Opin. Pharmacol.* 2005; 5, 293-302.
- (58) a) Weiner, L.; Kreimer, D.; Roth, E.; Sihan, I. Oxidative stress transforms acetylcholinesterase to a molten-globule-like state. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 1994; 198; 915-922. b) Millard,



---

C.B.; Shnyrov, V.L.; Newstead, S.; Shin, I.; Roth, E.; Silman, I.; Weiner, L. Stabilization of a metastable state of *Torpedo californica* acetylcholinesterase by chemical chaperones. *Protein Sci.* **2003**, *12*, 2337-2347.

(59) a) Shi, J.; Tai, K.; McCammon, J.A.; Taylor, P.; Johnson, D.A. Nanosecond dynamics of the mouse acetylcholinesterase cys69-cys96 omega loop. *J. Biol. Chem.* 2003, *278*, 30905-30911; b) Kua, J.; Zhang, Y.; McCammon, J.A. Studying enzyme binding specificity in acetylcholinesterase using a combined molecular dynamics and multiple docking approach. *J. Am. Chem. Soc.* 2002, *124*, 8260-8267; c) Senapati, S.; Bui, J.M.; McCammon, J.A. Induced fit in mouse acetylcholinesterase upon binding a femtomolar inhibitor: a molecular dynamics study. *J. Med. Chem.* 2005, *48*, 8155-6812; d) Zhou, H.X.; Wlodek, S.T.; McCammon, J.A. Conformation gating as a mechanism for enzyme specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 1998, *95*, 9280-9283; e) Tai, K.; Shen, T.; Henchman, R.H.; Bourne, Y.; Marchot, P.; McCammon, J.A. Mechanism of acetylcholinesterase inhibition by fasciculin: a 5-ns molecular dynamics simulation. *J. Am. Chem. Soc.* 2002, *124*, 6153-6161; g) Gilson, M.K.; Straatsma, T.P.; McCammon, J.A.; Ripoll, D.R.; Faerman, C.H.; Axelsen, P.H.; Silman, I.; Sussman, J.L. Open "back door" in a molecular dynamics simulation of acetylcholinesterase. *Science*; 1994, *263*, 1276-1278; h) Wlodek, S.T.; Clark, T.W.; Scott, L.R.; McCammon, J.A. Molecular dynamics of acetylcholinesterase dimer complexed with tacrine. *J. Am. Chem. Soc.* 1997, *119*, 9513-9522; i) Shen, T.; Tai, K.; Henchman, R.H.; McCammon, J.A. Molecular dynamics of acetylcholinesterase. *Acc. Chem. Res.* 2002, *35*, 332-340; j) Senapati, S.; Cheng, Y.; McCammon, J.A. In-situ synthesis of a tacrinetriazole-based inhibitor of acetylcholinesterase: configurational selection imposed by steric interactions. *J. Med. Chem.* 2006, *49*, 6222-6230.

(60) Arkin, M.R.; Wells, J.A. Small-molecule inhibitors of protein-protein interactions: progressing towards the dream, *Nat Rev Drug Discov.* 2004, *3*, 301-317.

(61) Dauber-Osguthorpe, P.; Roberts, V. A.; Osguthorpe, D. J.; Wolff, J.; Genest, M.; Hagler, A. T. Structure and energetics of ligand binding to proteins: *E. coli* dihydrofolate reductase-trimethoprim, a drug-receptor system. *Proteins* 1988, *4*, 31-47.

(62) Dewar, M.J.S.; Thiel, W. Ground states of molecules. 38. The MNDO method. Approximations and parameters. *J. Am. Chem. Soc.* 1977, *99*, 4899-4907.

(63) a) Savini, L.; Gaeta, A.; Fattorusso, C.; Catalanotti, B.; Campiani, G.; Chiasserini, L.; Pellerano, C.; Novellino, E.; McKissic, D.; Saxena, A. Specific targeting of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase recognition sites. Rational design of novel, selective, and highly

---

potent cholinesterase inhibitors. *J. Med. Chem.* 2003, 46, 1-4. b) Campiani, G.; Fattorusso, C.; Butini, S.; Gaeta, A.; Agnusdei, M.; Gemma, S.; Persico, M.; Catalanotti, B.; Savini, L.; Nacci, V.; Novellino, E.; Holloway, H. W.; Greig, N. H.; Belinskaya, T.; Fedorko, J. M.; Saxena, A.; Development of Molecular Probes for the Identification of Extra Interaction Sites in the Mid-Gorge and Peripheral Sites of Butyrylcholinesterase (BuChE). Rational Design of Novel, Selective, and Highly Potent BuChE Inhibitors; *J. Med. Chem.* 2005, 48, 1919-1929.

(64) Fletcher, R. Unconstrained Optimization. In *Practical Methods of Optimization*; John Wiley & Sons: New York 1980, Vol.1.

(65) Senderowitz, H.; Guarnieri, F.; Still, W.C. A Smart Monte Carlo Technique for Free Energy Simulations of Multiconformational Molecules. Direct Calculations of the Conformational Populations of Organic Molecules. *J. Am. Chem. Soc.* 1995, 117, 8211-8219.

(66) Ding, H. Q.; Karasawa, N.; Goddard, W. A., III Atomic level simulations on a million particles: The cell multipole method for Coulomb and London non-bond interactions. *J. Chem. Phys.* 1992, 97, 4309-4315.

(67) Hunter, C.A.; Lawson, K.R.; Perkins, J.; Urch, C.J. Aromatic interactions. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. I.* **2001**, 2, 651-669.

(68) Cubero, E.; Luque, J.F.; Orozco, M. Is polarization important in cation- $\pi$  interactions?. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 5976-5980.

(69) Kim, K.S.; Tarakeshwar, P.; Yong Lee, J. Molecular clusters of  $\pi$ -Systems: Theoretical Studies of Structures, Spectra, and Origin of Interaction Energies. *Chem. Rev.* **2000**, 100, 4145-4185.

(70) Colletier, J.P.; Sanson, B.; Nachon, F.; Gabellieri, E.; Fattorusso, C.; Campiani, G.; Weik, M. Conformational Flexibility in the Peripheral Site of Torpedo Californica Acetylcholinesterase Revealed by the Complex Structure with a Bifunctional Inhibitor *J. Am. Chem. Soc.* 2006, 128, 4526-4527.

(71) Harel, M.; Quinn, D.M.; Nair, H.K.; Silman, I.; Sussman, J.L. The X-ray structure of a transition state analog complex reveals the molecular origins of the catalytic power and substrate specificity of acetylcholinesterase. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 2340-2346.

(72) Briseno-Roa, L.; Hill, J.; Notman, S.; Sellers, D.; Smith, A.P.; Timperley, C.M.; Wetherell, J.; Williams, N.H.; Williams, G.R.; Fersht, A.R.; Griffiths, A.D. Analogues with fluorescent leaving

---

groups for screening and selection of enzymes that efficiently hydrolyze organophosphorus nerve agents. *J. Med. Chem.* **2006**, *49*, 246-255.

(73) Perola, E.; Cellai, L.; Lamba, D.; Filocamo, L.; Brufani, M. Long chain analogs of physostigmine as potential drugs for Alzheimer's disease: new insights into the mechanism of action in the inhibition of acetylcholinesterase. *Biochimica et Biophysica Acta, Protein Structure and Molecular Enzymology*, **1997**, *1343*, 41-50.

(74) Worek, F.; Thiermann, H.; Szinicz, L.; and Eyer, P. Kinetic analysis of interactions between human acetylcholinesterase, structurally different organophosphorus compounds and oximes. *Biochem. Pharmacol.* **2004**, *68*, 2237-2248.

(75) Greenblatt, H.M.; Kryger, G.; Lewis, T.; Silman, I.; Sussman, J.L. Structure of acetylcholinesterase complexed with (-)-galanthamine at 2.3 Å resolution. *FEBS Lett.* **1999**, *463*, 321-326.

(76) Carlier, P. R.; Du, D.-M.; Han, Y.-F.; Liu, J.; Pang, Y.-P. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1999**, *9*, 2335-2338.

(77) Radic, Z.; Pickering, N.A.; Vellom, D.C.; Camp, S.; Taylor, P. Three distinct domains in the cholinesterase molecule confer selectivity for acetyl- and butyrylcholinesterase inhibitors. *Biochemistry*, **1993**, *32*, 12074-84.

(78) Barak, D.; Kronman, C.; Ordentlich, A.; Ariel, N.; Bromberg, A.; Marcus, D.; Lazar, A.; Velan, B.; Shafferman, A. Acetylcholinesterase peripheral anionic site degeneracy conferred by amino acid arrays sharing a common core. *J. Biol. Chem.* **1994**, *269*, 6296-305.

(79) Kuca, K.; Cabal, J.; Kassa, J.; Jun, D.; Hrabínova, M. A comparison of the potency of the oxime HLo-7 and currently used oximes (HI-6, pralidoxime, obidoxime) to reactivate nerve agent-inhibited rat brain acetylcholinesterase by in vitro methods. *Acta Medica (Hradec Kralove)* **2005**, *48*, 81-6.

(80) Pang, Y.P.; Kollmeyer, T.M.; Hong, F.; Lee, J.C.; Hammond, P.I.; Haugabouk, S.P.; Brimijoin, S. Rational design of alkylene-linked bis-pyridiniumaldoximes as improved acetylcholinesterase reactivators. *Chem Biol.* **2003**, *10*, 491-502.

- 
- (82) Bourne, Y.; Kolb, H.C.; Radic, Z.; Sharpless, K.B.; Taylor, P.; Marchot, P. Freeze-frame inhibitor captures acetylcholinesterase in a unique conformation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2004, 101, 1449-1454.
- (83) Rydberg, E.H.; Brumshtein, B.; Greenblatt, H.M.; Wong, D.M.; Shaya, D.; Williams, L.D.; Carlier, P.R.; Pang, Y.P.; Silman, I.; Sussman, J.L. Complexes of Alkylene-Linked Tacrine Dimers with Torpedo Californica Acetylcholinesterase: Binding of Bis(5)-Tacrine Produces a Dramatic Rearrangement in the Active-Site Gorge. *J. Med. Chem.* 2006, 49, 5491-5500.
- (84) Scholl, F.G.; Scheiffele P. Making connections: cholinesterase-domain proteins in the CNS. *Trends Neurosci.* 2003, 26, 618-624.
- (85) Arkin, M.R.; Wells, J.A.; Small-molecule inhibitors of protein-protein interactions: progressing towards the dream. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2004, 3, 301-317.
- (86) Feng, S.; Kasahara, C.; Rickles, R.J.; Schreiber, S.L. Specific interactions outside the proline-rich core of two classes of Src homology 3 ligands. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995, 92, 12408-12415.
- (87) Heuer, K.; Kofler, M.; Langdon, G.; Thiemke, K.; Freund, C.; Structure of a Helically Extended SH3 Domain of the T Cell Adapter Protein ADAP. *Structure*, 2004, 12, 603-610.
- (88) Mayer, B.J. SH3 domains: complexity in moderation. *J. of Cell Science*, 2001, 114, 1253-1263.
- (89) Hur, E.; Pfaff, S.J.; Payne, E.S.; Gron, H.; Buehrer, B.M.; Fletterick, R.J. Recognition and accommodation at the androgen receptor coactivator binding interface. *Plos Biol.* 2004, 2, E274.
- (90) Dubbink, H.J.; Hersmus, R.; Verma, C.S.; Van der Korput, H.A.; Berrevoets, C.A.; Van Tol, J.; Ziel-van der Made, A.C.; Brinkmann, A.O.; Pike, A.C.; Trapman, J. Distinct recognition modes of FXXLF and LXXLL motifs by the androgen receptor. *Mol. Endocrinol.* 2004, 18, 2132-2150.
- (91) Greiner, E.F.; Kirfel, J.; Greschik, H.; Huang, D.; Becker, P.; Kapfhammer, J.P.; Schule, R. Differential ligand-dependent protein-protein interactions between nuclear receptors and a neuronalspecific cofactor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2000, 97, 7160-7165.
- (92) Dubbink, H.J.; Hersmus, R.; Verma, C.S.; van der Korput, H.A.; Berrevoets, C.A.; van Tol, J.; Ziel-van der Made, A.C.; Brinkmann, A.O.; Pike, A.C.; Trapman, J. Distinct recognition modes of FXXLF and LXXLL motifs by the androgen receptor. *Mol Endocrinol.* 2004, 18, 2132-2150.

---

(93) He, B.; Kempainen, J.A.; Wilson, E.M. FXXLF and WXXLF sequences mediate the NH<sub>2</sub>-terminal interaction with the ligand binding domain of the androgen receptor. *J. Biol. Chem.* 2000, 275, 22986-22994.